

JOÃO JOSÉ INÁCIO SILVA

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE LEVEDURAS NO
FILOPLANO DE PLANTAS SELECCIONADAS DO
PARQUE NATURAL DA SERRA DA ARRÁBIDA**

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de
Doutor em Biologia (especialidade Microbiologia), pela
Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e
Tecnologia.

Lisboa

2003

nº de arquivo

“Copyright”

JOÃO JOSÉ INÁCIO SILVA

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE DE LEVEDURAS NO
FILOPLANO DE PLANTAS SELECCIONADAS DO
PARQUE NATURAL DA SERRA DA ARRÁBIDA**

Dissertação apresentada para obtenção do Grau de
Doutor em Biologia (especialidade Microbiologia), pela
Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e
Tecnologia.

Lisboa

2003

Parte deste trabalho inseriu-se no projecto “Avaliação, caracterização e conservação da biodiversidade microbiana no Parque Natural da Serra da Arrábida, um ecossistema do tipo mediterrânico” (PRAXIS XXI – 2/2.1/BIA/413/94).

O autor auferiu de uma bolsa de doutoramento PRAXIS XXI/BD/19833/99, financiada pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

Agradecimentos

A todos os colegas e amigos que, directa ou indirectamente, apoiaram e colaboraram na realização dos trabalhos apresentados nesta dissertação.

Aos Professores Wolfgang Ludwig (Universidade Técnica de Munique, Freising, Alemanha) e Rudolf Amann (Instituto Max-Planck de Microbiologia Marinha, Bremen, Alemanha), pelo seu apoio durante os períodos em que trabalhei nas suas instituições.

Aos meus orientadores, Professores Álvaro Fonseca e Isabel Spencer-Martins, pelo seu apoio, incentivo e disponibilidade durante a realização dos trabalhos, e precioso auxílio na preparação desta dissertação.

Aos meus pais, Amílcar e Leonor, a quem muito agradeço, especialmente, o esforço realizado durante os anos iniciais da minha formação. Ao meu irmão, Filipe, pelo seu incentivo.

À Sónia, pelo seu constante apoio, incentivo e compreensão.

Resumo

Os ecossistemas do tipo mediterrânico não têm sido investigados como habitat natural de populações microbianas em geral, e de leveduras em particular. Um dos objectivos deste estudo foi o de apreciar a abundância, diversidade e variação sazonal das leveduras epifíticas no filoplano de plantas representativas de um ecossistema do tipo mediterrânico em Portugal, neste caso o Parque Natural da Arrábida. Foram seleccionados dois locais de amostragem na Serra da Arrábida, Fonte do Veado (FV), com um microclima mais húmido, e Mata do Solitário (MS), mais seco e árido, e cinco plantas: *Acer monspessulanum* e *Quercus faginea* (folha caduca), e *Cistus albidus*, *Pistacia lentiscus* e *Osyris quadripartita* (folha perene). O isolamento de leveduras foi baseado em dois métodos complementares: plaqueamento de suspensões resultantes das lavagens das folhas e o método SFM (*Spore-Fall Method*), mais específico para leveduras balistoconidiogénicas.

Cerca de 90% das leveduras isoladas do filoplano (de um total de cerca de 850 estirpes) são de afinidade basidiomiceta, representando pelo menos 67 espécies. Destas, cerca de metade não parecem corresponder a espécies conhecidas e aproximadamente 75% do número total de espécies foram isoladas apenas uma vez ou ocorreram com baixa frequência. Entre as poucas leveduras ascomicetas isoladas, a grande maioria parecem tratar-se de possíveis estados leveduriformes do fungo fitopatogénico dimórfico *Taphrina* (grupo dos fungos arquiascomicetas). Aproximadamente 15% das espécies foram isoladas a partir da maioria das amostras, independentemente da planta, local e data de amostragem, como por exemplo *Cryptococcus* cf. *laurentii*, *Erythrobasidium* cf. *hasegawianum*, *Rhodotorula* cf. *slooffiae*, *Sporobolomyces* cf. *roseus*, *Rh. bacarum*, *Tilletiopsis* spp. e *Lalaria inositophila* sp. nov.. Também isoladas de várias folhas, mas com uma distribuição aparentemente menos ampla, aparecem espécies como *Sp. coprosmae* e *Sp. gracilis*. Foram registados casos de distribuição restrita de algumas espécies, em contraste com a aparente inespecificidade das leveduras do filoplano relativamente às plantas colonizadas. O mais saliente foi o de *Cryptococcus* sp. nov. 1 que foi isolada com uma frequência relativamente elevada apenas a partir de folhas de *Ci. albidus*, tanto na FV como na MS, e em várias amostragens.

Para as espécies de plantas presentes em ambos os locais de amostragem (*Q. faginea*, *Ci. albidus* e *Pi. lentiscus*) observou-se que, de um modo geral, as populações de leveduras nos respectivos filoplanos são maiores na FV do que na MS. Esta diferença não parece reflectir-se, porém, na diversidade em termos do número de espécies isoladas. Foi detectado um aumento, da Primavera para o Outono, do número de leveduras presentes nas folhas das plantas de folha caduca *Ac. monspessulanum* e *Q. faginea*, acompanhando o seu desenvolvimento. Esta variação sazonal não foi aparente nas plantas de folha perene. Nas folhas de *Pi. lentiscus* e *O. quadripartita* as leveduras ocorreram, consistentemente, em

menor número. Foram encontradas densidades muito variáveis para a população de leveduras nos diferentes filoplanos amostrados, desde 10 UFC.cm⁻², obtida em *Pi. lentiscus* e *O. quadripartita*, até valores da ordem de 10⁴ UFC.cm⁻², obtidos numa das amostragens de *Q. faginea*.

É concebível que as leveduras do filoplano tenham propriedades que lhes permitem sobreviver e multiplicar-se no ambiente em que se encontram. Nesse sentido, realizou-se uma pesquisa de natureza preliminar num grupo seleccionado das leveduras isoladas do filoplano: (i) capacidade de utilização de compostos aromáticos, ácidos aldáricos e aminoácidos como fontes de carbono e de energia; (ii) produção de certas enzimas extracelulares; (iii) produção de pigmentos do tipo melanina, e (iv) actividade antimicrobiana. Foi particularmente notória a produção de enzimas extracelulares por *Cryptococcus* spp. (Filobasidiales), *Tilletiopsis* spp. (classe Ustilaginomicetas) e *Sp. cf. roseus* (Sporidiobolus). Uma grande parte das estirpes testadas demonstrou ainda capacidade para utilizar, como fontes de carbono e de energia, vários compostos que ocorrem em plantas, nomeadamente aminoácidos como o ácido glutâmico e a prolina, açúcares (p.e. celobiose e L-arabinose) e compostos aromáticos (p.e. ácidos protocatecuico e *p*-hidroxibenzóico). Cerca de 65% das estirpes produziram culturas melanizadas a partir de pelo menos um dos compostos precursores utilizados, com realce para as leveduras representantes do grupo das Filobasidiales e algumas da classe Ustilaginomicetas. Não se detectou uma produção significativa de compostos antimicrobianos por qualquer das leveduras testadas.

Este trabalho também visou o desenvolvimento de um método molecular, baseado na hibridação *in situ* com sondas de DNA marcadas com fluorocromos (FISH), para a detecção e identificação das leveduras directamente nos seus meios naturais, evitando recorrer à sua cultura e isolamento. Foram, primeiro, optimizados os procedimentos para o desenho das sondas, através da construção de ferramentas informáticas para a recolha e comparação de sequências de DNA e testes de especificidade *in silico*, e determinados os locais do rRNA 18S e da região D1/D2 do rRNA 26S mais acessíveis para a hibridação. O método foi, então, aplicado para re-avaliar a aparente associação observada entre *Cryptococcus* sp. nov. 1 e as folhas de *Ci. albidus*. Com uma sonda específica que se desenhou para esta espécie de levedura, foram detectadas células de *Cryptococcus* sp. nov. 1 em suspensões celulares resultantes da lavagem de folhas de *Ci. albidus*, mas não quando se utilizaram folhas das outras plantas estudadas. Em consequência deste estudo, observou-se que a densidade de *Cryptococcus* sp. nov. 1 em folhas individuais de *Ci. albidus* não parece seguir uma distribuição normal, apresentando um comportamento semelhante ao evidenciado para as densidades das populações bacterianas, para as quais é o logaritmo das densidades que está distribuído normalmente. As folhas apresentaram densidades até 370 células de *Cryptococcus* sp. nov. 1 por cm², mas a grande maioria exibiu densidades inferiores a 40 células/cm².

Abstract

Mediterranean ecosystems have not been consistently investigated as natural habitats for microbes in general, and yeasts in particular. Therefore, the main objective of this study was to assess the diversity, abundance and seasonal variation of epiphytic yeasts on the phylloplane of selected plants found on 'Serra da Arrábida', an ecosystem of Mediterranean characteristics in Portugal ('Arrábida Natural Park'). Leaves from the species *Acer monspessulanum* and *Quercus faginea* (deciduous trees), and *Cistus albidus*, *Pistacia lentiscus* and *Osyris quadripartita* (evergreen shrubs), were collected twice a year for two consecutive years, at two distinct locations of 'Serra da Arrábida': the wetter Northern slope ('Fonte do Veado' - FV) and the drier Southern slope ('Mata do Solitário' - MS).

The composition of yeast populations present on the phylloplane was studied after isolation using both a conventional method, based on plating of leaf washings, and the Spore-Fall Method (SFM), specific for balistoconidiogenic yeasts. The yeasts recovered were mostly of basidiomycetous affinity (~ 90% out of ca. 850 isolates), representing at least 67 distinct species, approximately 50% of which are, at present, unrecognised. About 75% of the total number of yeast species were very rarely found (one or two isolates). Among the few ascomycetous isolates, significant numbers of presumptive yeast stages of *Taphrina* spp. (Archiascomycetes) were found. Several yeast species (15%) were present on all leaves, irrespective of plant species, sampling site or season (e.g. *Cryptococcus* cf. *laurentii*, *Erythrobasidium* cf. *hasegawianum*, *Rhodotorula* cf. *slooffiae*, *Sporobolomyces* cf. *roseus*, *Rh. bacarum*, *Tilletiopsis* spp. and *Lalaria inositophila* sp. nov.). Others were consistently, but less frequently, isolated from the phylloplane (e.g. *Sp. coprosmae* and *Sp. gracilis*). Despite an apparent lack of specificity of phylloplane yeasts suggested in studies by other authors, in the present work we detected a restricted distribution of some species. The most striking example is that of *Cryptococcus* sp. nov. 1, which was isolated in exceptionally high densities only from leaves of *Ci. albidus* in all samples analysed.

For the plants present in both sampling sites (*Q. faginea*, *Ci. albidus* and *Pi. lentiscus*), the total yeast population densities were generally higher on samples from FV than on leaves collected at MS. The diversity of yeast species, however, did not show the same trend. The yeast populations on deciduous trees (*Ac. monspessulanum* and *Q. faginea*) increased from Spring to Autumn, following leaf development, whereas yeast counts were fairly constant on the evergreens. The number of isolates from both *Pi. lentiscus* and *O. quadripartita* were consistently low, especially from the latter. In general, yeast population densities varied between 10 CFU.cm⁻² (e.g. on *Pi. lentiscus* and *O. quadripartita*) and 10⁴ CFU.cm⁻² (e.g. in one of the samples from *Q. faginea*).

Phylloplane yeasts might have properties related to the composition and characteristics of the habitat they colonise. In this context, the production of extracellular hydrolytic enzymes

and antimicrobial compounds, melanization capacity and assimilation of specific compounds present in plants (e.g. aromatic compounds and aminoacids) by a selection of the isolated phylloplane yeasts were investigated. Among these *Cryptococcus* spp. (Filobasidiales), *Tilletiopsis* spp. (Ustilaginomycetes) and *Sp. cf. roseus* (Sporidiobolus) were found to be very versatile in terms of extracellular enzyme production. The majority of yeasts tested utilised plant-occurring substrates, such as aminoacids (e.g. glutamate and proline), sugars (e.g. cellobiose and L-arabinose) and aromatic compounds (e.g. protocatechuic and *p*-hydroxybenzoic acids) as carbon and energy sources. Production of melanin-like pigments was positive for about 65% of the yeasts tested, and this production was especially abundant by members of Filobasidiales and a few ustilaginomycetous yeasts. No significant antimicrobial activity was detected in any of the yeasts tested.

A molecular method, based on Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH), was developed in order to identify and detect yeasts directly on leaf washings, thereby avoiding cultivation steps. Firstly, software tools were developed to perform, automatically, all tasks related to DNA probe design (e.g. retrieving of DNA sequences from public databases, comparative analysis and *in silico* specificity tests). The accessibility maps for probe hybridisation of the D1/D2 domains of the 26S rRNA and of the 18S rRNA were determined, using *Saccharomyces cerevisiae* as a model, thereby directing the search for specific probe targets localized in the most accessible regions of the rRNA. The method developed was used to revisit the apparent association between *Cryptococcus* sp. nov. 1 and *Ci. albidus* leaves detected with the conventional culture-dependent approach. A specific oligonucleotide fluorescently labelled probe was designed for the direct detection and quantification of that yeast in leaf washings. Cells of *Cryptococcus* sp. nov. 1 were successfully spotted and quantified in washings of *Ci. albidus* leaves, and their absence confirmed in leaf washings from the other sampled plants. As a result of this investigation, we observed that the densities of *Cryptococcus* sp. nov. 1 on individual leaves is not normally distributed, though the logarithms of those values are. This observation is in agreement with the distribution of bacterial populations on the phylloplane. Densities of *Cryptococcus* sp. nov. 1 on leaves were up to 370 cells/cm², but the majority were less than 40 cells/cm².

Lista de Abreviaturas

Ac.	Ácido
C	Citosina
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i> , Utrecht, Holanda
cf.	Conforme
CMA	Meio <i>Corn Meal Agar</i>
D1/D2	Domínios 1 e 2 do rRNA 26S
D,L-DOPA	D,L-3,4-di-hidroxifenilalanina
DABA	Ácido 3,4-Diaminobenzóico
DBB	Corante Azul de Diazónio B
DBSA	Ácido 2,5-diaminobenzenosulfónico
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleótido-trifosfato
DO	Densidade Óptica (= Absorvência)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EtBr	Brometo de Etídio
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridisation</i>
G	Guanina
GA	Ácido Gálico
GeA	Ácido Gentísico
HCl	Ácido Clorídrico
IGS	<i>Intergenic Spacer</i> (unidade de rDNA)
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (Unidade de rDNA)
JCM	<i>Japan Collection of Microorganisms</i> , Riken, Saitama, Japão
NA	Meio <i>Nutrient Agar</i>
mAP	3-Aminofenol
m.t	<i>Mating-Type</i>
MSP-PCR	<i>Micro-Satellite Primed PCR</i>
MYP	Meio de Extracto de Malte, Extracto de levedura e <i>Soytone</i> .
NRRL	<i>ARS Culture Collection</i> , Peoria, USA
PA	Ácido Protocatecuico
pASA	Ácido 4-Aminosalicílico
pb	Pares de bases
PBS	Tampão Salino de Fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	Meio <i>Potato Dextrose Agar</i>
PDC	<i>Pancreatic Digest of Casein</i>
PNA	<i>Peptide Nucleic Acid</i>
ppm	Partes por milhão
p/v	peso/volume
PYCC	<i>Portuguese Yeast Culture Collection</i> , FCT/UNL, Monte de Caparica, Portugal
rDNA	Ácido Desoxirribonucleico ribossómico
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido Ribonucleico ribossómico
SDS	Dodecil-Sulfato de Sódio
SFM	<i>Spore-fall method</i>
SSC	<i>Standard Saline Citrate</i>

Lista de Abreviaturas (Cont.)

TBE	Tampão Tris, Ácido Bórico e EDTA
TE	Tampão Tris/EDTA
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Radiação Ultravioleta
v/v	volume/volume
var.	Variedade
YCB	Meio <i>Yeast Carbon Base</i>
YM	Meio <i>Yeast Malt Extract</i>
YNB	Meio <i>Yeast Nitrogen Base</i>

Lista de abreviaturas de gêneros de microrganismos

A.	<i>Aureobasidium</i>
B.	<i>Bullera</i>
Bu.	<i>Bulleromyces</i>
C.	<i>Candida</i>
Cr.	<i>Cryptococcus</i>
D.	<i>Dioszegia</i>
Dek.	<i>Dekkera</i>
Ery.	<i>Erythrobasidium</i>
E.	<i>Escherichia</i>
F.	<i>Filobasidium</i>
Fi.	<i>Filobasidiella</i>
H.	<i>Holtermannia</i>
L.	<i>Lalaria</i>
Occ.	<i>Occultifur</i>
P.	<i>Pichia</i>
Ps.	<i>Pseudozyma</i>
Rh.	<i>Rhodotorula</i>
S.	<i>Saccharomyces</i>
Sp.	<i>Sporobolomyces</i>
T.	<i>Torulopsis</i>
Tap.	<i>Taphrina</i>
Tr.	<i>Trichosporon</i>
Z.	<i>Zygosaccharomyces</i>

Lista de abreviaturas de gêneros de plantas

Ac.	<i>Acer</i>
Ci.	<i>Cistus</i>
O.	<i>Osyris</i>
Pi.	<i>Pistacia</i>
Q.	<i>Quercus</i>

Índice de Matérias

Capítulo I

Introdução geral

I. Introdução Geral	3
I.1. Ecologia de leveduras	3
I.2. O filoplano como habitat	5
I.3. Leveduras do filoplano	9
I.4. Características dos microrganismos colonizadores do filoplano	13
I.5. Ecologia microbiana do filoplano: métodos de estudo	14
I.6. Objectivos do trabalho realizado e plano da dissertação	16

Capítulo II

Ocorrência, diversidade e distribuição de leveduras isoladas do filoplano

II.1. Introdução	21
II.2. Material e Métodos	25
II.2.1. Locais de amostragem	25
II.2.2. Plantas amostradas	25
II.2.3. Recolha das amostras	25
II.2.4. Isolamento de leveduras	26
II.2.5. Identificação das leveduras isoladas	27
II.2.6. Determinação do índice de Shannon-Weaver e construção das curvas de rarefacção	34
II.3. Resultados e Discussão	35
Variação espacial (Fonte do Veado vs. Mata do Solitário)	41
Variação sazonal	44
Variação com a espécie de planta	45

Capítulo III

Caracterização taxonómica dos isolados

III.1. Introdução	51
III.1.1. Noções sobre classificação de leveduras	51
Classificação das leveduras ascomicetas	51
Classificação das leveduras basidiomicetas	53
Urediniomicetas	53
Himenomicetas	58
Ustilaginomicetas	62
III.1.2. Caracterização taxonómica de leveduras	62
Métodos convencionais	62
Métodos moleculares	63
O conceito de espécie em taxonomia de leveduras	68
III.2. Material e Métodos	70

Determinação de polimorfismos de regiões mini- e micro-satélite (MSP-PCR)	70
Alinhamento de sequências de DNA e construção de árvores filogenéticas	71
Análise comparativa do DNA nuclear	71
Extracção de DNA genómico	71
Purificação do DNA	72
Determinação da pureza da solução de DNA	72
Reassociação DNA/DNA	72
III.3. Resultados e Discussão	74
III.3.1. Taxonomia de isolados da classe Himenomicetas	74
Linhagem Tremellales – leveduras produtoras de pigmento laranja	74
Linhagem Tremellales – <i>Bulleromyces</i> sp. nov., <i>Bullera</i> spp. e <i>Cryptococcus</i> spp.	82
Linhagem Filobasidiales	89
Linhagem Cystofilobasidiales	95
III.3.2. Taxonomia de isolados da classe Urediniomicetas	98
Linhagem Erythrobasidium	98
Grupo <i>Sporobolomyces gracilis</i> e <i>Rhodotorula aurantiaca</i>	98
Grupo <i>Erythrobasidium hasegawianum</i>	107
Grupo <i>Rhodotorula minuta</i>	109
Linhagem Sporidiobolus	112
Linhagens Agaricostilbum e Microbotryum	117
III.3.3. Taxonomia de isolados da classe Ustilaginomicetas	119
III.3.4. Taxonomia de isolados do grupo dos fungos Arquiascomicetas	123
Estados leveduriformes de <i>Taphrina</i> spp.	123

Capítulo IV

Aspectos fisiológicos e bioquímicos das leveduras isoladas

IV.1. Introdução	131
IV.2. Material e Métodos	134
IV.2.1. Produção de proteases	134
Hidrólise de L-alanina 7-amida-4-metil-cumarina	134
Hidrólise de gelatina	134
Hidrólise da caseína	136
IV.2.2. Produção de polissacarases	136
Amilases	136
Xilanases	136
Celulases	137
IV.2.3. Produção de pectinases	137
Degradação oxidativa de n-hexadecano	137
IV.2.4. Produção de nucleases	138

IV.2.5. Produção de lipases	138
Hidrólise de azeite	138
Hidrólise de TWEEN 80	138
IV.2.6. Utilização de aminoácidos e compostos aromáticos como fonte de carbono e de energia	139
IV.2.7. Produção de pigmentos tipo-melanina	139
IV.2.8. Produção de actividades antimicrobianas	140
IV.3. Resultados e Discussão	142
IV.3.1. Actividades enzimáticas	142
IV.3.2. Assimilação de aminoácidos e de outras fontes de carbono	149
IV.3.3. Produção de pigmentos tipo-melanina	156
IV.3.4. Actividades antimicrobianas	162

Capítulo V

Deteção directa de leveduras no filoplano: ecologia molecular

V.1. Introdução	167
V.1.1. Desenvolvimento de sondas para FISH	167
Alvos	167
Pesquisa de segmentos de DNA específicos	168
Marcação das sondas de DNA	168
V.1.2. Fixação e permeabilização das células	170
V.1.3. Hibridação <i>in situ</i>	171
V.1.4. Deteção da hibridação	172
Microscopia de epifluorescência	172
Citometria de fluxo	172
V.1.5. Dificuldades associadas à hibridação <i>in situ</i>	172
Concentração celular	172
Autofluorescência	173
Especificidade das sondas	173
Conteúdo celular em rRNA	173
Inacessibilidade das regiões-alvo das sondas	174
V.1.6. Exemplos de aplicação de FISH a leveduras e fungos dimórficos	174
V.2. Material e Métodos	178
V.2.1. Desenvolvimento de programas informáticos	178
V.2.2. Estudo da acessibilidade do rRNA de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	178
Cultura e fixação das células	178
Desenho das sondas de DNA	178
Marcação das sondas e controlo de qualidade	178
Reacção de hibridação <i>in situ</i>	179
Citometria de fluxo	179
V.2.3. Determinação da velocidade de substituição nucleotídica	182

V.2.4. Hibridação <i>in situ</i> com sondas de DNA	182
Desenho de sondas de DNA específicas	182
Hibridação <i>in situ</i>	182
V.2.5. Detecção de leveduras sem isolamento em cultura	185
Recolha das folhas de plantas e fixação das amostras	185
Hibridação <i>in situ</i>	185
V.3. Resultados e Discussão	186
V.3.1. Estudo da acessibilidade do rRNA de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	186
Acessibilidade da região D1/D2 do rRNA 26S	186
Possibilidade de extrapolação dos resultados	189
Acessibilidade vs grau de conservação nucleotídica da região D1/D2	189
Acessibilidade do rRNA 18S	192
Acessibilidade vs grau de conservação nucleotídica do rRNA 18S	198
V.3.2. Desenho de sondas de DNA para hibridação <i>in situ</i>	198
Diferenciação entre fungos basidiomicetas e ascomicetas	198
Desenvolvimento de sondas para leveduras isoladas do filo plano	202
Otimização das condições de hibridação <i>in situ</i>	204
V.3.3. Aplicação de FISH a amostras de folhas	207
Quantificação de <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 1 em folhas individuais de <i>Cistus albidus</i>	213
 Capítulo VI – Considerações finais e perspectivas	 217
 Referências Bibliográficas	 229
 Apêndice I - Meios de cultura e soluções	
Meios de cultura	247
Composição das soluções de oligoelementos	247
Soluções para extracção rápida de DNA, PCR e visualização de bandas	248
Solução para aplicação das amostras no gel de agarose	248
Soluções para experiências de reassociação DNA/DNA	248
Soluções para hibridação <i>in situ</i>	250
 Apêndice II - Resultados dos testes preliminares	 251
 Apêndice III - Resultados dos testes fisiológicos	 271
 Apêndice IV - Aplicações computacionais desenvolvidas	 297
IV.1. Desenvolvimento de um programa para a identificação de leveduras	299
IV.2. Desenvolvimento de um programa para o desenho de sondas de DNA	299

Índice de Figuras

Capítulo I

Figura 1.1	Representação da árvore filogenética dos seres vivos, que inclui os três domínios Bacteria, Archaea e Eukarya, com a indicação da localização dos Fungos.	4
Figura 1.2	A - Superfície de uma gramínea ; B - Tricomas glandulares em folhas de tomateiro; C - tricomas e secreção glandular numa folha de lavanda; D - Fungo filamentoso na superfície de uma folha de <i>Dahlia</i> sp.; E – Superfície de uma folha de <i>Juglans regia</i> , colonizada por leveduras e bactérias; F – Bactérias na superfície de uma folha de feijoeiro.	7

Capítulo II

Figura 2.1	A - Localização da Serra da Arrábida no mapa de Portugal; B - Plantas seleccionadas para o estudo sobre as populações de leveduras no filo plano.	22
Figura 2.2	Código para a designação das estirpes isoladas.	28
Figura 2.3	Esquema da organização mais frequente dos genes do rRNA na unidade de rDNA em leveduras, e localização da região D1/D2, região ITS e dos <i>primers</i> utilizados para a sequenciação das duas regiões.	33
Figura 2.4	Contagens totais de leveduras no filo plano das plantas amostradas, para cada data de amostragem. São indicadas as proporções de diferentes tipos de leveduras isoladas de cada planta, assim como o índice de diversidade de Shannon-Weaver.	37
Figura 2.5	Frequência relativa da ocorrência das diferentes espécies de leveduras no filo plano das plantas amostradas, de acordo com o local e data de amostragem.	39
Figura 2.6	Curvas de rarefacção ilustrativas de tendências em termos de riqueza em espécies de leveduras, em diferentes plantas e alturas do ano.	40
Figura 2.7	Distribuição das frequências das diferentes espécies de leveduras no filo plano das plantas estudadas. A – <i>Quercus faginea</i> , B – <i>Cistus albidus</i> e C – <i>Pistacia lentiscus</i>), na amostragem de Novembro de 1998.	43

Capítulo III

Figura 3.1	Árvore filogenética baseada na análise da sequência nucleotídica do gene do rRNA 18S de 93 espécies de fungos.	52
Figura 3.2	Árvore filogenética baseada na análise da sequência nucleotídica da região D1/D2, do gene do rRNA 26S, de membros dos Urediniomicetas.	57
Figura 3.3	Árvore filogenética baseada na análise da sequência nucleotídica da região D1/D2, do gene do rRNA 26S, de membros dos Himenomicetas.	61
Figura 3.4	Árvore filogenética baseada na análise da sequência nucleotídica da região D1/D2, do gene do rRNA 26S, de membros dos Ustilaginomicetas.	65
Figura 3.5	Dendrograma de isolados de leveduras da classe Himenomicetas, linhagem Tremellales, produtoras de colónias de cor laranja, construído com base na comparação de perfis de bandas de DNA obtidos por MSP-PCR com o <i>primer</i> M13.	77
Figura 3.6	Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de leveduras produtoras de colónias de cor laranja, e outras espécies da linhagem Tremellales.	78

Figura 3.7	Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA de leveduras produtoras de colônias de cor laranja, e outras espécies da linhagem Tremellales.	81
Figura 3.8	Estruturas da fase sexuada de <i>Bulleromyces</i> sp. nov., resultantes do cruzamento das estirpes A2AVS4 e A2QVS11, após um mês de incubação em meio CMA sólido.	84
Figura 3.9	Perfis de bandas de DNA obtidas por MSP-PCR com o <i>primer</i> M13 para estirpes de <i>Bulleromyces</i> sp. nov. e de PYCC 4534.	86
Figura 3.10	Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de leveduras da linhagem Tremellales.	87
Figura 3.11	Dendrograma de isolados de leveduras da classe Himenomicetas, linhagem Filobasidiales, construído com base na comparação de perfis de bandas de DNA obtidas por MSP-PCR com o <i>primer</i> M13	90
Figura 3.12	Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de leveduras da linhagem Filobasidiales.	91
Figura 3.13	Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA de leveduras da linhagem Filobasidiales.	92
Figura 3.14	Estruturas da fase sexuada de <i>Filobasidium</i> sp. nov., resultantes do cruzamento das estirpes 3CSF10 e 6CVF16, após um mês de incubação em meio MYP sólido.	94
Figura 3.15	Estruturas da fase sexuada de <i>Cystofilobasidium</i> sp. nov. (1OSS1), após um mês de incubação em meio MYP sólido.	96
Figura 3.16	Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de membros da linhagem Cystofilobasidiales, classe Himenomicetas.	97
Figura 3.17	Dendrograma de isolados de leveduras da classe Urediniomicetas, linhagem Erythrobasidium, relacionadas com o grupo <i>Sporobolomyces gracilis</i> e <i>Rhodotorula aurantiaca</i> , construído com base na comparação de perfis de bandas de DNA obtidos por MSP-PCR com o <i>primer</i> M13.	101
Figura 3.18	Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de membros da linhagem Erythrobasidium, classe Urediniomicetas.	102
Figura 3.19	Micélio com ansas de anastomose resultante do cruzamento entre A3PVV1 e A1CSV3, identificadas como <i>Sporobolomyces coprosmae</i> , após um mês de incubação em meio MYP sólido .	104
Figura 3.20	Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA de leveduras relacionadas com <i>Sporobolomyces gracilis</i> e <i>Rhodotorula aurantiaca</i> , linhagem Erythrobasidium, classe Urediniomicetas.	106
Figura 3.21	Dendrograma de isolados de leveduras da classe Urediniomicetas, linhagem Erythrobasidium, relacionadas com o grupo <i>Erythrobasidium hasegawianum</i> , construído com base na comparação de perfis de bandas de DNA obtidos por MSP-PCR com o <i>primer</i> M13.	108
Figura 3.22	Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA de leveduras relacionadas com <i>Erythrobasidium hasegawianum</i> , linhagem Erythrobasidium, classe Urediniomicetas.	110
Figura 3.23	Dendrograma de isolados de leveduras da classe Urediniomicetas, linhagem Erythrobasidium, relacionadas com o grupo <i>Rhodotorula minuta</i> , construído com base na comparação de perfis de bandas de DNA obtidos por MSP-PCR com o <i>primer</i> M13.	111
Figura 3.24	Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de leveduras relacionadas com <i>Rhodotorula sloffiae</i> .	113
Figura 3.25	Dendrograma de isolados de leveduras da classe Urediniomicetas, linhagem Sporidiobolus, relacionadas com <i>Sporobolomyces roseus</i> , construído com base na comparação de perfis de bandas de DNA obtidas por MSP-PCR com o <i>primer</i> (GTG) ₅ .	114

Figura 3.26	Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de membros da linhagem <i>Sporidiobolus</i> , classe Urediniomycetas.	115
Figura 3.27	Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de membros das linhagens <i>Microbotryum</i> e <i>Agaricostilbum</i> , classe Urediniomycetas.	118
Figura 3.28	Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de membros dos Ustilaginomycetas.	121
Figura 3.29	Dendrogramas de isolados de leveduras da classe Ustilaginomycetas, construído com base na comparação de perfis de bandas de DNA obtidas por MSP-PCR com o <i>primer</i> M13.	122
Figura 3.30	Dendrograma de isolados de leveduras do grupo dos Arquiascomycetas, construído com base na comparação de perfis de bandas de DNA obtidas por MSP-PCR com o <i>primer</i> (GAC) ₅ .	125
Figura 3.31	Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de membros dos Arquiascomycetas.	126
Figura 3.32	Árvore filogenética baseada na análise da sequência nucleotídica da região ITS do rDNA de membros dos Arquiascomycetas.	127

Capítulo IV

Figura 4.1	Ilustração dos ensaios para detecção de actividades enzimáticas.	135
Figura 4.2	Esquema do procedimento utilizado para a pesquisa da produção de actividades antimicrobianas por algumas das leveduras isoladas do filo plano.	141
Figura 4.3	Frequências relativas da produção de actividades enzimáticas para cada um dos grupos taxonómicos representados de entre as leveduras isoladas do filo plano.	145
Figura 4.4	Ilustração dos resultados dos ensaios de assimilação de aminoácidos.	152
Figura 4.5	Frequências relativas da capacidade de assimilação de aminoácidos como fonte de carbono e de energia para cada um dos grupos taxonómicos representados pelas leveduras isoladas do filo plano.	153
Figura 4.6	Frequências relativas da capacidade de assimilação de hidratos de carbono, ácidos aldáricos e compostos aromáticos para cada um dos grupos taxonómicos representados pelas leveduras isoladas do filo plano.	155
Figura 4.7	Ilustração dos resultados dos ensaios para testar a produção de pigmentos tipo-melanina a partir dos compostos precursores ácido gentísico (GeA) e ácido 4-aminosalicílico (pASA).	159
Figura 4.8	Frequências relativas da produção de pigmentos para cada um dos grupos taxonómicos representados pelas leveduras isoladas do filo plano.	160

Capítulo V

Figura 5.1	Intensidade relativa dos sinais fluorescentes obtidos com as 32 sondas dirigidas à região D1/D2 do rRNA 26S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	187
Figura 5.2	Intensidade dos sinais de fluorescência obtidos em reacções de hibridação <i>in situ</i> em diferentes condições de restringência, para um sub-grupo de sondas pertencentes às classes de acessibilidade mais baixas da região D1/D2 do rRNA 26S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	190
Figura 5.3	Comparação da acessibilidade da região D1/D2 do rRNA 26S em <i>S. cerevisiae</i> e em outras espécies de leveduras, em relação a um sub-grupo de sondas com um alvo complementar nesta região e pertencentes às várias classes de acessibilidade encontradas.	191

Figura 5.4	Comparação da acessibilidade da região D1/D2 do rRNA 26S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para sondas de DNA marcadas com Cy3 com o grau de conservação das sequências.	193
Figura 5.5	Intensidade relativa dos sinais fluorescentes obtidos com as 112 sondas dirigidas ao rRNA 18S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	196
Figura 5.6	Intensidade do sinal fluorescente obtido em reacções de hibridação <i>in situ</i> , em diferentes condições de restringência, para um sub-grupo de sondas correspondentes às classes de acessibilidade mais baixas do rRNA 18S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	197
Figura 5.7	Comparação da acessibilidade do rRNA 18S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com o grau de conservação das sequências nucleotídicas.	199
Figura 5.8	Fragmento da sequência nucleotídica do rDNA 18S no qual se insere a região-alvo de várias leveduras ascomicetas e basidiomicetas complementar da sonda BASID18.	201
Figura 5.9	Hibridação das sondas EUK516, BASID18 e Dan651 com células de diversas leveduras ascomicetas e basidiomicetas.	203
Figura 5.10	Especificidade das sondas Cci167, Ery162, Rba364 e Scg167, marcadas com Cy3, em reacções com várias concentrações de formamida no Tampão de Hibridação.	205
Figura 5.11	Efeito do tempo de fixação na morfologia celular e na intensidade da fluorescência emitida por diferentes leveduras após hibridação com as sondas EUK516 e BASID18.	206
Figura 5.12	Hibridação <i>in situ</i> com células recolhidas ao longo da curva de crescimento.	208
Figura 5.13	Hibridações <i>in situ</i> com as sondas específicas desenhadas e testadas com várias espécies de leveduras isoladas do filoplano de plantas amostradas neste trabalho.	211
Figura 5.14	Ilustração dos resultados das experiências de hibridação <i>in situ</i> com a sonda Cci167, aplicada a suspensões resultantes das lavagens de folhas de <i>Cistus albidus</i> , <i>Acer monspessulanum</i> , <i>Pistacia lentiscus</i> e <i>Quercus faginea</i> .	212
Figura 5.15	Diagramas <i>Rankit</i> para <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 1, detectado por hibridação <i>in situ</i> com a sonda Cci167 em lavagens de 39 folhas de <i>Cistus albidus</i> .	214

Capítulo VI

Figura 6.1	Espécies de leveduras isoladas do filoplano, com indicação do número de isolados e respectivo grupo taxonómico.	220
Figura 6.2	Pesquisa de actividades eventualmente relevantes para a colonização do filoplano pelas leveduras isoladas.	224
Figura 6.3	Ilustração do procedimento adoptado para a aplicação da técnica FISH à detecção e quantificação de <i>Cryptococcus</i> sp. nov. 1 a partir de folhas de <i>Cistus albidus</i> .	226

Apêndice IV

Figura IV.1	Interfaces principais do programa YEAST 3000 – <i>FISIO COMPARE</i> .	300
Figura IV.2	Interfaces do programa YEAST 3000 – <i>Sequence Search Engine</i> .	302
Figura IV.3	Formatos de armazenamento de sequências de DNA: A – formato FASTA, B – formato FAS, baseado no formato FASTA e implementado neste trabalho.	304
Figura IV.4	Interfaces do programa informático YEAST 3000 – <i>Probe Design</i> .	305
Figura IV.5	Interfaces do programa informático YEAST 3000 – <i>Probe Match</i> .	307

Índice de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1.1	Resumo sobre a ocorrência de leveduras isoladas no filoplano de diversas plantas.	11
-------------------	---	----

Capítulo II

Tabela 2.1	Compostos utilizados nos testes de assimilação para a identificação de leveduras.	30
-------------------	---	----

Capítulo III

Tabela 3.1	Características gerais das leveduras ascomicetas e basidiomicetas.	51
Tabela 3.2	Características discriminantes das leveduras basidiomicetas das classes Ustilaginomicetas, Urediniomicetas e Himenomicetas e respectivos agrupamentos reconhecidos.	54
Tabela 3.3	Leveduras caracterizadas produtoras de pigmento laranja pertencentes à linhagem Tremellales, classe Himenomicetas, e respectiva origem.	76
Tabela 3.4	Testes fisiológicos discriminantes entre as espécies de leveduras caracterizadas produtoras de pigmento laranja e pertencentes à linhagem Tremellales	79
Tabela 3.5	Leveduras não pigmentadas caracterizadas pertencentes à linhagem Tremellales, classe Himenomicetas, e respectiva origem.	83
Tabela 3.6	Leveduras caracterizadas da linhagem Filobasidiales, classe Himenomicetas, e respectiva origem.	89
Tabela 3.7	Leveduras caracterizadas da linhagem Erythrobasidium, classe Urediniomicetas, e respectiva origem.	99
Tabela 3.8	Leveduras caracterizadas da linhagem Sporidiobolus, classe Urediniomicetas, e respectiva origem.	116
Tabela 3.9	Leveduras caracterizadas das linhagens Agaricostilbum e Microbotryum, classe Urediniomicetas, e respectiva origem.	117
Tabela 3.10	Leveduras caracterizadas da classe Urediniomicetas e respectiva origem.	119
Tabela 3.11	Leveduras caracterizadas do grupo dos fungos Arquiascomicetas e respectiva origem.	124

Capítulo IV

Tabela 4.1	Resultados da pesquisa da produção de actividades enzimáticas e capacidade de crescimento em n-hexadecano por uma selecção das leveduras isoladas do filoplano.	143
Tabela 4.2	Resultados da pesquisa da assimilação de aminoácidos por uma selecção das leveduras isoladas do filoplano.	150
Tabela 4.3	Resultados da pesquisa da produção de pigmentos tipo-melanina, em meio de cultura sólido com diferentes compostos precursores, por uma selecção das leveduras isoladas do filoplano.	157

Capítulo IV

Tabela 5.1	Fluorocromos mais utilizados para a marcação de sondas de DNA.	169
Tabela 5.2	Sequências e posição das sondas de DNA utilizadas para estudar a acessibilidade da região D1/D2 do rRNA 26S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PYCC 4455 ^T .	179
Tabela 5.3	Sequências e posição das sondas de DNA utilizadas para estudar a acessibilidade do rRNA 18S de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PYCC 4455 ^T .	180

Tabela 5.4	Sequências (e números de acesso do GenBank) utilizadas no alinhamento a partir do qual foi determinada a velocidade de substituição nucleotídica da região D1/D2 do rRNA 26S em fungos.	183
Tabela 5.5	Sequências (e números de acesso do GenBank) utilizadas no alinhamento a partir do qual foi determinada a velocidade de substituição nucleotídica do rRNA 18S em fungos.	184
Tabela 5.6	Intensidade absoluta e relativa (percentagem do valor obtido em relação à sonda D-223), da fluorescência emitida pelas células de <i>S. cerevisiae</i> , após hibridação <i>in situ</i> com as sondas de DNA marcadas com Cy3 e complementares da região D1/D2 do rRNA 26S.	188
Tabela 5.7	Intensidade absoluta e relativa (percentagem do valor obtido em relação à sonda P-1025), da fluorescência emitida pelas células de <i>S. cerevisiae</i> , após hibridação <i>in situ</i> com as sondas de DNA marcadas com Cy3 e complementares ao rRNA 18S.	194
Tabela 5.8	Sondas de DNA utilizadas neste trabalho e respectivos alvos.	200

Apêndice I

Tabela I.1	Equivalência entre a concentração de formamida no Tampão de Hibridação e as concentrações de cloreto de sódio e de EDTA no Tampão de Lavagem.	250
-------------------	---	-----

Apêndice II

Tabela II.1	Resultados da caracterização preliminar efectuada com as estirpes de levedura isoladas na amostragem de Março de 1997.	253
Tabela II.2	Resultados da caracterização preliminar efectuada com as estirpes de levedura isoladas na amostragem de Novembro de 1997.	255
Tabela II.3	Resultados da caracterização preliminar efectuada com as estirpes de levedura isoladas na amostragem de Março de 1998.	259
Tabela II.4	Resultados da caracterização preliminar efectuada com as estirpes de levedura isoladas na amostragem de Junho de 1998.	261
Tabela II.5	Resultados da caracterização preliminar efectuada com as estirpes de levedura isoladas na amostragem de Novembro de 1998.	263
Tabela II.6	Resultados da caracterização preliminar efectuada com as estirpes de levedura isoladas na amostragem de Março de 1999.	267

Apêndice III

Tabela III.A	Resultados dos testes fisiológicos de leveduras isoladas e identificadas neste trabalho e pertencentes à linhagem Tremellales, classe Himenomicetas.	273
Tabela III.B	Resultados dos testes fisiológicos de leveduras isoladas e identificadas neste trabalho e pertencentes à linhagem Filobasidiales, classe Himenomicetas.	279
Tabela III.C	Resultados dos testes fisiológicos de leveduras isoladas e identificadas neste trabalho e pertencentes à linhagem Cystofilobasidiales, classe Himenomicetas.	281
Tabela III.D	Resultados dos testes fisiológicos de leveduras isoladas e identificadas neste trabalho e pertencentes à linhagem Erythrobasidium, classe Urediniomicetas.	282
Tabela III.E	Resultados dos testes fisiológicos de leveduras isoladas e identificadas neste trabalho e pertencentes às linhagens Microbotryum, Agaricostilbum e Sporidiobolus, classe Urediniomicetas.	289
Tabela III.F	Resultados dos testes fisiológicos de leveduras isoladas e identificadas neste trabalho e pertencentes à classe Ustilaginomicetas.	291
Tabela III.G	Resultados dos testes fisiológicos de leveduras isoladas e identificadas neste trabalho e pertencentes ao grupo de fungos arquiomicetas.	293
Tabela III.H	Resultados dos testes fisiológicos de leveduras ascomicetas isoladas e identificadas neste trabalho.	295

CAPÍTULO I
Introdução geral

I. Introdução Geral

I.1. Ecologia de leveduras

As leveduras constituem um grupo de microrganismos integrado no Reino Fungi, domínio Eukarya (Figura 1.1), caracterizado por um crescimento vegetativo predominantemente unicelular e pela possibilidade de formação de estruturas sexuadas não encerradas em corpos frutíferos (Kurtzman 1994, Phaff *et al.* 1978). Terão evoluído de uma forma ancestral unicelular (Bandoni 1987, Oberwinkler 1987), compreendendo actualmente representantes dos Filos Ascomycota e Basidiomycota.

Para além das características genómicas, várias características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas permitem distinguir as leveduras ascomicetas das basidiomicetas (ver Cap. III), reflectindo-se, por vezes, no tipo de substratos colonizados por cada um destes grupos. Por exemplo, uma característica fisiológica presente em muitas leveduras ascomicetas, e ausente na grande maioria das basidiomicetas, é a capacidade de fermentar diversos açúcares, o que as leva a colonizar substratos com elevadas concentrações destes compostos (p.e. frutos e flores).

O tipo de substratos colonizados pelas leveduras reflecte os parâmetros que permitem o seu crescimento e sobrevivência, nomeadamente a gama de pH (em geral, valores de pH entre 3 e 8), temperatura (são normalmente mesófilos, com uma temperatura óptima de crescimento a rondar os 25 – 30 °C), oxigénio (são aeróbios obrigatórios ou anaeróbios facultativos) e actividade de água (não são raras as leveduras osmo e/ou halotolerantes).

As leveduras têm sido isoladas de substratos muito diversos. Em ambientes aquáticos, leveduras como *Debaryomyces hansenii*, *Candida austromarina* e *C. natalensis* (ascomicetas), assim como as dos géneros *Leucosporidium* e *Rhodospiridium* (basidiomicetas), são frequentemente isoladas a partir de amostras de água doce e salgada. Algumas espécies de *Metschnikowia* encontram-se associadas a invertebrados (*Daphnia* spp.), peixes ou algas. Para uma revisão acerca das leveduras isoladas de ambientes aquáticos ver Hagler e Ahearn (1987).

Outros tipos de substratos colonizados pelas leveduras são os de origem vegetal. As populações mais densas estão normalmente associadas a substratos que contêm açúcares e outras fontes de carbono rapidamente assimiláveis (flores, frutos, exsudados de plantas, etc.). Um exemplo é o da colonização de exsudados de árvores por leveduras como *Saccharomycodes ludwigii*, *Nadsonia elongata*, *Pichia* spp. e *Phaffia rhodozyma*. *Pichia*



Figura 1.1. Representação da árvore filogenética dos seres vivos, que inclui os três domínios Bacteria, Archaea e Eukarya, com a indicação da localização dos Fungos.

cactophila, *P. heedii* e *P. amethionina*, entre outras, são consideradas leveduras especificamente colonizadoras de tecidos senescentes de cactos. Frequentemente isoladas a partir de flores e frutos são as espécies *Hanseniaspora uvarum*, *Kloeckera apiculata* e *Metschnikowia* spp., entre muitas outras, geralmente de afinidade ascomiceta. Por vezes, as leveduras colonizadoras de frutos e flores ocorrem também em insectos, que poderão constituir vectores para a sua propagação. São exemplos *Ambrosiozyma* spp., *C. entomophila* e *C. insectorum*. A maior parte das leveduras são saprofíticas, mas algumas espécies são consideradas fitopatogénicas (p.e. *Eremothecium* spp. e *Itersonilia perplexans*). Algumas leveduras são repetidamente isoladas a partir de amostras de solo, como espécies do género *Lipomyces*, *Debaryomyces occidentalis* (ascomicetas) e algumas espécies de *Cryptococcus* (basidiomicetas). Para uma revisão acerca das leveduras isoladas de ambientes terrestres ver Last e Price (1969) e Phaff e Starmer (1987).

Algumas espécies de leveduras têm uma distribuição vasta, podendo ser encontradas em vários tipos de habitat, enquanto outras ocupam nichos ecológicos muito específicos (Phaff *et al.* 1978). Por exemplo, as espécies *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus albidus* e *Cr. laurentii* podem ser isoladas de amostras de natureza e origem geográfica diversas, enquanto, por exemplo, a espécie *Phaffia rhodozyma* tem sido isolada apenas de exsudados de certas árvores.

A ecologia de leveduras está ainda numa fase de desenvolvimento relativamente embrionária. A maioria dos estudos descreve a diversidade de leveduras isoladas a partir de determinados substratos e/ou as dimensões e variação sazonal das suas populações, correlacionando estas observações, por vezes, com condições climatéricas e tipo de material amostrado, entre outros factores.

I.2. O filoplano como habitat

As plantas (raízes, caule, folhas, flores, frutos, etc.) constituem um dos substratos mais abundantes para o desenvolvimento de uma vasta gama de microrganismos (Fokkema 1991), correspondendo a superfície das folhas, ou filoplano (Last 1955, Ruinen 1956), à sua maior área colonizável. A espécie de planta e o ambiente físico/químico que a caracteriza condicionam as propriedades destas superfícies e, conseqüentemente, a diversidade e dimensão das populações microbianas que aí se desenvolvem. Apesar de muitos dos microrganismos recém-chegados a este novo habitat não conseguirem sobreviver (Lindow e Andersen 1996), outros conseguem multiplicar-se em folhas saudáveis, podendo atingir populações numerosas (Dik *et al.* 1991). Os fungos, nos quais se incluem as leveduras,

representam um dos mais importantes grupos de microrganismos colonizadores do filoplano (Allsopp *et al.* 1995, Bills e Polishook 1994, Jager *et al.* 2001, Kirk 1995).

O filoplano constitui para os microrganismos colonizadores uma enorme planície aparentemente hostil, não uniforme, cheia de elevações e depressões, ceras, cristais minerais, estomas, nervuras, pêlos, tricomas, glândulas de diversos tipos, entre outras estruturas (Hallam e Juniper 1971, Wu e Kuo-Huang 1997). Esta superfície (Figura 1.2) pode mesmo variar numa única folha ao longo do tempo (Mechaber *et al.* 1996), em resultado de processos bióticos e/ou abióticos que podem ter efeitos importantes na densidade e composição relativa da população microbiana.

Os nutrientes disponíveis no filoplano, e que servem de base ao desenvolvimento das populações microbianas colonizadoras, resultam de secreções das próprias folhas, naturais ou provenientes de feridas na cutícula (Tukey 1971), e de deposições esporádicas a partir da atmosfera ou trazidas por insectos e outros organismos (Andrews e Harris 2000). Por exemplo, Warren (1972) encontrou uma correlação entre o aumento das populações de leveduras e a deposição de grãos de pólen em folhas. Está documentada a presença de vários açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, metanol e sais minerais no filoplano de diversas espécies de plantas (Blakeman 1972, Corpe e Rheem 1989, Fiala *et al.* 1990, Irvine *et al.* 1978, Purnell e Preece 1971, Tukey 1970, Wildman e Parkinson 1981). Os nutrientes disponíveis (fontes de carbono e de azoto) são, no entanto, relativamente limitados em comparação com outros habitats (Frossard *et al.* 1983, Tukey 1970), dependendo ainda a sua abundância da idade da folha, espécie de planta e condições ambientais envolventes.

Os nutrientes podem encontrar-se inacessíveis aos microrganismos devido, por exemplo, a uma deficiente difusão (Mercier e Lindow 2000), ou a uma distribuição espacial variável (Leveau e Lindow 2001) em função de factores tais como as estruturas microscópicas existentes na superfície das folhas. Estes últimos autores verificaram, utilizando biossensores, que a concentração de determinados açúcares, como a frutose, pode ter grandes variações, mesmo em regiões adjacentes na superfície de uma mesma folha. Para além de nutrientes, no filoplano também se detectam compostos antimicrobianos, eventualmente produzidos pelos próprios microrganismos, que podem limitar e seleccionar os microrganismos colonizadores (Irvine *et al.* 1978). Já foram, por exemplo, descritos antagonismos entre fungos filamentosos e leveduras (Fokkema 1973).

A disponibilidade de água é outro factor condicionante neste tipo de habitat, tanto devido à sua importância fundamental para o metabolismo dos microrganismos colonizadores como para que ocorra uma eficiente difusão dos nutrientes na superfície das folhas, tornando-os

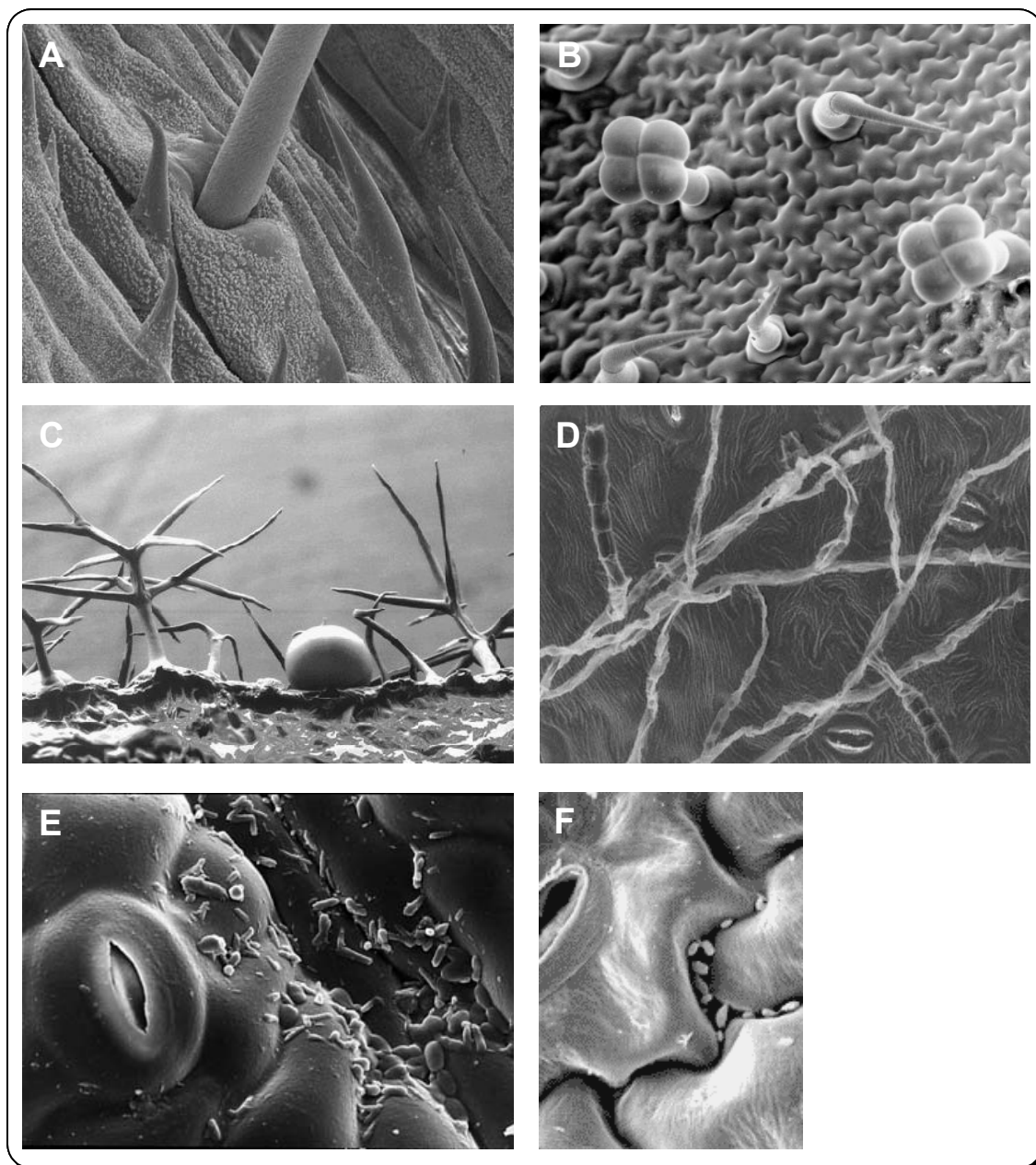


Figura 1.2. **A** - Superfície de uma gramínea (Copyright Dennis Kunkel - www.denniskunkel.com); **B** - Tricomas glandulares em folhas de tomateiro (Copyright CIMC - www.cimc.cornell.edu); **C** - tricomas e secreção glandular numa folha de lavanda (Copyright CMM - www.uq.edu.au/nanoworld); **D** - Fungo filamentososo na superfície de uma folha de *Dahlia* sp. (Copyright Dennis Kunkel); **E** - Superfície de uma folha de *Juglans regia*, colonizada por leveduras e bactérias (www.biozentrum.uni-wuerzburg.de); **F** - Bactérias na superfície de uma folha de feijoeiro (www.micro.iastate.edu).

disponíveis (Mercier e Lindow 2000). Bashir e Fokkema (1977) verificaram que é sempre necessária a presença de água (humidade, precipitação ou orvalho), pelo menos durante uma parte do dia, para a utilização de nutrientes. Diem (1974) verificou também que em folhas de cevada existia normalmente uma micobiota pouco numerosa e diversificada, mas após períodos húmidos prolongados as populações fúngicas desenvolviam-se. A superfície da folha tende no entanto a ser seca, sendo a quantidade de água disponível em cada momento, em cada folha, determinada, entre outros factores, pela hidrofobicidade desta superfície (Lindow 1991). Um outro factor particularmente importante neste tipo de habitat é a exposição a radiações ionizantes, raios ultravioleta, e a diferenças drásticas e rápidas de temperatura.

A folha, na perspectiva de habitat, poderá ser considerada como um ambiente extremo (Hirano e Upper 2000). Tal não se deve necessariamente a que algumas características ambientais sejam mais drásticas do que noutros ambientes realmente extremos (p.e. variações de temperatura, exposição a raios UV, humidade, exposição ao vento e disponibilidade de nutrientes), mas ao facto de que todos estes factores contribuem para que a superfície das folhas não seja uniformemente colonizada, numa mesma folha ou em folhas localizadas, por exemplo, em diferentes posições nas copas das árvores. Frequentemente, as populações dos microrganismos colonizadores desenvolvem-se preferencialmente junto de estruturas como tricomas, nervuras, estomas, pêlos, etc. (Andrews 1992, Andrews *et al.* 2002, Beattie e Lindow 1999, Kinkel 1997), devido, por exemplo, à acumulação de células nas depressões, à secreção diferenciada de nutrientes (Rodger e Blakeman 1984) e à protecção das células em relação ao microambiente envolvente (Beattie e Lindow 1999). As populações tendem ainda a ser mais densas na página inferior das folhas, em oposição à página superior (Kinkel 1997), embora se conheçam diversas excepções (Breeze e Dix 1981). Pugh e Buckley (1971) verificaram, por exemplo, que as populações de *Sporobolomyces* spp. eram mais abundantes na página superior das folhas, e particularmente ao longo das nervuras. Esta observação foi mais tarde confirmada por Lindsey e Pugh (1976), num estudo das leveduras presentes em folhas de *Hippophae rhamnoides*. As populações microbianas colonizadoras do filoplano tendem ainda a ser mais densas nas folhas exteriores das copas das árvores e arbustos (Andrews *et al.* 1980, Jacques *et al.* 1995).

A quantidade e composição das populações de microrganismos colonizadores do filoplano, incluindo leveduras, para além da influência dos factores bióticos e abióticos já mencionados, serão resultantes do balanço de diversos eventos, nomeadamente de processos de: imigração (Lindow e Andersen 1996), correspondendo à chegada de novos indivíduos e/ou esporos à superfície das folhas (espalhados pelo vento, chuva, insectos,

etc.); emigração, correspondendo à exclusão e desaparecimento de indivíduos da superfície das folhas (devido, por exemplo, à remoção pela chuva); crescimento, correspondente ao incremento das populações por multiplicação celular; e, morte celular. Cada um destes processos tem uma importância relativa que varia com o tempo e as condições ambientais (Kinkel 1997).

Thompson *et al.* (1995) observaram que o número de bactérias em folhas de cana-de-açúcar aumentava durante a noite, diminuindo depois ao longo do dia, apesar de não terem verificado variações significativas no número de leveduras nestas mesmas folhas. Em relação a variações sazonais, e de um modo geral, as populações de fungos e leveduras presentes no filoplano aumentam com o desenvolvimento das folhas, atingindo um pico no Verão ou Outono (Breeze e Dix 1981, Fokkema e Schippers 1986, Hogg e Hudson 1966, Last e Price 1969). O inóculo inicial que coloniza as folhas jovens, em plantas de folha caduca, poderá ter origem em alguma população que se mantenha, por exemplo, na casca dos troncos, ramos e gomos, ao longo do Inverno (Andrews e Kenerley 1980, Buck *et al.* 1998). Ao longo do processo de desenvolvimento das folhas, as populações de bactérias, predominantes no início, vão sendo gradualmente ultrapassadas pelos fungos filamentosos e leveduras (Wildman e Parkinson 1979), podendo a competição pelos nutrientes ser um factor fundamental nesta sucessão (Blakeman 1985, Rodger e Blakeman 1984). Breeze e Dix (1981) referem ainda que a biomassa total de leveduras e fungos dimórficos presentes nas folhas de *Acer platanooides* é superior à dos fungos filamentosos normalmente colonizadores do filoplano, tais como *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Stemphylium* e *Alternaria*.

A correlação entre a idade das folhas e um maior desenvolvimento das populações microbianas foi já observada por vários autores (Di Menna 1959, Dickinson 1967, Last 1955), sendo normalmente atribuída ao aumento de exsudados com o envelhecimento e à redução de compostos antifúngicos com origem vegetal (Irvine *et al.* 1978).

I.3. Leveduras do filoplano

As leveduras têm sido isoladas do filoplano de diferentes espécies de plantas, tanto de regiões temperadas como tropicais (Jager *et al.* 2001, Last e Price 1969, Phaff e Starmer 1987, Ruinen 1963). Pertencem, geralmente, aos géneros de afinidade basidiomiceta *Cryptococcus* (leveduras não pigmentadas – p.e. *Cr. laurentii*), *Sporobolomyces* e *Rhodotorula* (leveduras pigmentadas – p.e. *Sp. roseus*) (McCormack *et al.* 1994, Phaff e Starmer 1987, Ruinen 1963). Além de *Sporobolomyces* spp., outras leveduras produtoras de balistoconídios, como *Bullera* e o fungo dimórfico *Tilletiopsis*, são também frequentemente

isoladas das folhas de diversas espécies de plantas (Hamamoto e Nakase 1995, Nakase 2000), especulando-se que estejam particularmente adaptadas a este tipo de habitat devido à produção de balistoconídios com mecanismo de dispersão próprio. As leveduras isoladas do filoplano poderão ser específicas deste tipo de ambiente, não sendo tão frequentemente encontradas, de modo consistente, em outros ambientes, nomeadamente no solo (Di Menna 1959). No entanto, não têm sido descritos casos de leveduras que apenas ocorram no filoplano de determinada planta, ou grupo de plantas. As leveduras ascomicetas, embora possam representar importantes colonizadores do filoplano (Middelhoven 1997, Phaff e Starmer 1987), são predominantemente isoladas a partir de outras superfícies das plantas, como as flores e os frutos (Phaff e Starmer 1987).

Ruinen (1963) isolou, num estudo não quantitativo, a partir de diversas folhas de árvores e arbustos tropicais, 65 estirpes de leveduras basidiomicetas dos géneros *Cryptococcus*, *Sporobolomyces* e *Rhodotorula*, e algumas estirpes dos géneros ascomicetas *Hansenula* e *Candida*, correspondendo a um total de 16 espécies distintas. Entre estas leveduras, os membros do género *Cryptococcus* representavam quase metade das estirpes isoladas, na sua grande maioria pertencentes à linhagem das Tremellales da classe dos fungos Himenomicetas (ver Cap. III), seguidos das espécies do género *Rhodotorula*. Mais recentemente, Jager *et al.* (2001) estudaram as populações microbianas do filoplano da mangueira (*Mangifera indica*), também característica de regiões tropicais, registando a presença de leveduras dos géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Torulopsis* e *Trichosporon*, assim como do fungo dimórfico *Aureobasidium pullulans* e que, no seu conjunto podiam atingir populações da ordem de 10^4 UFC/cm² de folha. *A. pullulans* e *Sporobolomyces roseus* foram as espécies mais abundantes. Separam estes dois estudos quase quarenta anos e, apesar de terem sido amostradas plantas e locais muito diferentes, as observações destes autores em termos do tipo de leveduras encontradas assemelham-se de forma surpreendente. A identificação das leveduras ao nível da espécie continuou, no entanto, relativamente insuficiente. Na Tabela 1.1 apresenta-se um resumo dos trabalhos mais relevantes em que se registou a ocorrência de leveduras no filoplano de diversas plantas.

Foram, por exemplo, realizados vários estudos sobre as leveduras presentes em folhas de trigo (*Triticum aestivum* - Tabela 1.1). Flannigan e Campbell (1977) verificaram que as estirpes predominantes eram representantes das espécies *Sp. roseus* e *Torulopsis ingensiosa*. Também foram encontradas nesse estudo *Cr. laurentii* e *Cr. albidus*, entre outras espécies (Tabela 1.1). Os autores depararam-se com dificuldades tanto na identificação das leveduras isoladas, chamando a atenção para as limitações das metodologias aplicadas, como na detecção de determinadas espécies minoritárias nas populações presentes. Num

Tabela 1.1. Resumo sobre a ocorrência de leveduras isoladas do filo plano de diversas plantas

Planta	Leveduras	Observações	Referência
Gramíneas	<i>Rhodotorula</i> ; <i>Sporobolomyces</i>	Densidades da ordem $10^5 - 10^7$ UFC/g	di Menna (1959)
Várias plantas tropicais	<i>Cryptococcus</i> ; <i>Sporobolomyces</i> ; <i>Rhodotorula</i> ; <i>Hansenula</i> ; <i>Candida</i> ; (<i>Aureobasidium</i>)	Leveduras pigmentadas predominantes	Ruinen (1963)
<i>Fagus sylvatica</i> (Faia)	<i>Sporobolomyces roseus</i> ; <i>Bullera</i>	Planta de folha caduca; Método SFM	Hogg e Hudson (1966)
<i>Malus domestica</i> (Macieira)	<i>Sp. roseus</i> ; <i>Rhodotorula</i> ; <i>Cryptococcus laurentii</i>	Densidades da ordem 10^6 UFC/g	Hislop e Cox (1969)
<i>Typha latifolia</i>	<i>Sp. roseus</i>	Método lavagem das folhas	Pugh e Mulder (1971)
<i>Hippophae rhamnoides</i>	<i>Sporobolomyces</i>	Método SFM e lavagens das folhas	Lindsey e Pugh (1976)
<i>Triticum aestivum</i> (Trigo)	<i>Sp. roseus</i>	Densidades da ordem $10^3 - 10^4$ UFC/cm ²	Bashi e Fokkema (1977)
<i>Larix decidua</i> (conífera)	<i>Rhodotorula glutinis</i> ; <i>Sp. roseus</i> ; <i>Cryptococcus</i> ; <i>Torulopsis</i>	Maiores densidades no Outono (10^4 UFC/g)	McBride e Hayes (1977)
<i>Triticum aestivum</i> (Trigo)	<i>Sp. roseus</i> ; <i>Torulopsis ingeniola</i> ; <i>Cr. laurentii</i> ; <i>Cryptococcus albidus</i> ; <i>Rh. glutinis</i> ; <i>Trichosporon cutaneum</i> ; <i>Cystoflobasidium macerans</i>	—	Flannigan e Campbell (1977)
<i>Malus domestica</i> (Macieira)	<i>Rhodotorula</i> ; <i>Sporobolomyces</i> ; <i>Cryptococcus</i>	Densidades da ordem 10^7 UFC/g	Andrews e Kenerley (1978)
<i>Ilex aquifolium</i> (Azevinho)		Maiores densidades no Outono (10^3 UFC/cm ²)	Mishra e Dickinson (1981)
<i>Malus domestica</i> (Macieira)	<i>Cr. laurentii</i> ; <i>T. ingeniola</i> ; <i>Rhodotorula rubra</i> ; <i>Sp. roseus</i> ; <i>Bullera alba</i> ; <i>Udeniomyces pyricola</i> ; <i>Tilletopsis</i>	Densidades da ordem 10^4 UFC/cm ²	Pennycook e Newhook (1981)
<i>Triticum aestivum</i> (Trigo)		Densidades da ordem 10^4 UFC/cm ²	Rabinge et al. (1984)
<i>Triticum aestivum</i> (Trigo) e <i>Malus domestica</i> (Macieira)	<i>Citeromyces</i> ; <i>Cryptococcus laurentii</i> ; <i>Rhodotorula</i> ; <i>Sporobolomyces (roseus)</i>	—	McCormack et al. (1994)
<i>Milicia excelsa</i>	<i>Cr. laurentii</i> ; <i>Candida</i> ; <i>Rhodotorula</i>	—	Li et al. (1995)
Várias plantas mediterrâneas	<i>Debaryomyces hansenii</i> ; <i>Cr. laurentii</i> ; <i>Cr. albidus</i> ; <i>Rh. glutinis</i> ; <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ; <i>Pseudozyma</i>	—	Middelhoven (1997)
<i>Mangifera indica</i> (Mangueira)	<i>Candida</i> ; <i>Cryptococcus</i> ; <i>Kluyveromyces</i> ; <i>Rhodotorula</i> ; <i>Sporobolomyces</i> ; <i>Torulopsis</i> ; <i>Trichosporon</i> ; (<i>Aureobasidium pullulans</i>)	Densidades da ordem 10^4 UFC/cm ²	Jager et al. (2001)
<i>Agrostis palustris</i> (gramínea)	Leveduras maioritariamente não pigmentadas	Maiores densidades no Outono ($10^4 - 10^5$ UFC/cm ²)	Buck e Burpee (2002)

outro trabalho, Rabinge *et al.* (1984) verificaram que as populações de leveduras no mesmo tipo de folhas atingiam dimensões da ordem de 10^4 UFC/cm².

Foram também publicados alguns estudos acerca das leveduras colonizadoras de folhas de macieira (*Malus domestica*). Hislop e Cox (1969) verificaram a presença de *Sp. roseus*, *Rhodotorula* spp. e *Cr. laurentii* nessas folhas, atingindo a população total de leveduras valores da ordem de 10^6 UFC/g. Também Andrews e Kenerley (1978) observaram que as leveduras nas folhas da mesma planta ocorriam em concentrações da ordem de 10^7 UFC/g, incluindo espécies dos gêneros *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Cryptococcus*. Pennycook e Newhook (1981), utilizando uma combinação dos métodos SFM e de isolamento a partir de uma suspensão de folhas maceradas, verificaram que as leveduras predominantes pertenciam às espécies *Cr. laurentii*, *Torulopsis ingensiosa* e *Rh. rubra*. Também regularmente isoladas pelo método de maceração das folhas foram as leveduras produtoras de balistoconídios *Sp. roseus*, *Bullera alba* e *Udeniomyces (Bullera) pyricola*, tendo ainda sido registado a ocorrência de *Tilletiopsis* sp.

No que concerne à dimensão das populações de fungos filamentosos e leveduras no filoplano, Fokkema e Schippers (1986) observaram que a variação da sua distribuição em folhas individuais segue uma distribuição normal, diferente da distribuição associada à dimensão das populações bacterianas no mesmo habitat (Fokkema e Schippers 1986, Hirano *et al.* 1982, Kinkel *et al.* 1995). No entanto, muito recentemente, Woody *et al.* (2003) observaram que a dimensão das populações de *A. pullulans* e de leveduras e fungos filamentosos em folhas individuais de macieira seguem uma distribuição semelhante à observada para as populações bacterianas, em que é o logaritmo dessas dimensões que segue uma distribuição normal (Fokkema e Schippers 1986).

Pouco se sabe acerca do papel das leveduras saprofíticas como colonizadoras do filoplano. Deverá estar relacionada com o próprio processo de decomposição, tanto mais que muitas das leveduras que aí ocorrem têm a capacidade de assimilar diversos compostos aromáticos presentes na folha (Sampaio e Fonseca 1995). São muito raros os relatos acerca da fitopatogenicidade das leveduras isoladas de plantas (Fell *et al.* 2001), apesar de muitos outros fungos filogeneticamente próximos o serem, como por exemplo a maioria dos membros da classe de fungos ustilaginomicetas (Bandoni 1995).

I.4. Características dos microrganismos colonizadores do filoplano

Não existem estudos consistentes sobre as características comuns a microrganismos colonizadores do filoplano, que lhes permitam sobreviver e, eventualmente, multiplicar-se neste ambiente. As barreiras lipídicas das membranas da célula vegetal e da cutícula das folhas dificultam a libertação de nutrientes para a sua superfície. Ruinen (1966) defendeu, baseada em observações de microscopia, que *Cr. laurentii* e *Rhodotorula glutinis* conseguiam degradar a cutícula das folhas. Na verdade, a actividade lipolítica foi demonstrada na maioria das estirpes pertencentes aos géneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula* isoladas a partir do filoplano de várias plantas tropicais por Ruinen (1963). Mais recentemente, Middelhoven (1997) verificou também a produção de cutinases e lipases, entre outras enzimas extracelulares, por algumas leveduras isoladas do filoplano de plantas das ilhas Canárias. Também segundo Motzel e Cook (1958), a degradação da cutícula e de outras substâncias estruturais das folhas poderão representar uma vantagem para os microrganismos colonizadores do filoplano.

Os polímeros nos materiais lenhocelulósicos, como a celulose e o xilano, constituem também obstáculos à biodegradação, pelo que a produção de enzimas extracelulares que degradem estas substâncias constitui uma importante vantagem competitiva para os fungos saprófitos colonizadores do filoplano (Melin 1948). A assimilação de açúcares de baixo peso molecular, como a sacarose, a maltose e a celobiose, e de polissacáridos de reserva, como a inulina e o amido, presentes na maioria das plantas, podem também ser uma importante característica dos colonizadores do filoplano (Middelhoven 1997), assim como a utilização de compostos aromáticos (p. e. ácidos *p*-cumárico, ferúlico, gálico e tânico), alguns com um papel importante na defesa das plantas contra insectos (Sampaio e Fonseca 1995). Middelhoven (1997) isolou várias espécies de leveduras do filoplano de plantas mediterrânicas, observando que a grande maioria das estirpes degradavam e assimilavam muitos dos constituintes das plantas.

Outro tipo de características dos microrganismos do filoplano poderá envolver a resistência à secura (Roszak e Colwell 1987), a tolerância a poluentes e a inibidores presentes nas plantas (Beveridge e Hugo 1965), e a resistência a radiações ionizantes e ultra-violeta. Alguns autores suscitam a hipótese da maior resistência das bactérias pigmentadas em relação às não-pigmentadas estar directamente relacionada com a presença dos compostos carotenóides, que protegem as células das radiações ultravioleta (Hirano e Upper 2000, Sundin e Jacobs 1999). Não existe, no entanto, qualquer estudo sobre a importância deste factor na colonização do filoplano por uma elevada proporção de leveduras pigmentadas.

A adesão das células à superfície das folhas poderá ser também uma importante adaptação para a colonização deste substrato. Bashi e Fokkema (1976) observaram que as leveduras no filopiano de algumas plantas produzem uma enorme quantidade de mucilagem. A produção destes polissacáridos extracelulares contribuirá para a adesão das células à superfície das folhas, assim como para amenizar as condições do próprio habitat em redor das células (Buck e Andrews 1999).

Alguns resultados apontam para que a produção de compostos antimicrobianos por leveduras normalmente presentes no filopiano seja um fenómeno comum, não partilhado por leveduras presentes em outros ambientes (McCormack *et al.* 1994). No entanto, os métodos laboratoriais até agora utilizados para a sua pesquisa poderão não ter sido os mais adequados. Por exemplo, Li *et al.* (1995) não encontraram qualquer efeito antagonista *in vitro* contra *Botrytis cinerea* de leveduras isoladas do filopiano de *Milicia excelsa*. No entanto, algumas estirpes de *Cr. laurentii* inibiam *in vivo* o desenvolvimento da doença provocada por este fungo filamentoso.

I.5. Ecologia microbiana do filopiano: métodos de estudo

A grande maioria dos estudos sobre a presença de leveduras e fungos dimórficos no filopiano utilizam metodologias baseadas em: (i) observação directa das folhas ao microscópio; (ii) impressões de folhas; e/ou (iii) plaqueamento de alíquotas de suspensões resultantes da sua lavagem/maceração, com posterior isolamento em cultura pura. Também bastante referido é o método SFM (*Spore-fall method* – ver Cap. II), que tira partido da projecção de balistoconídios à distância por algumas leveduras. Estes estudos focaram a sua atenção, essencialmente, nos fungos filamentosos presentes no filopiano, porque são mais fáceis de detectar e identificar com base nas características morfológicas. A identificação das leveduras fica-se, geralmente, pelo género (*Bullera*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* ou *Cryptococcus*), ou resume-se a uma ou duas espécies mais representadas, tais como *Sp. roseus* ou *Cr. laurentii*, consideradas espécies bastante heterogéneas e ubíquas. Certamente contribuíram para esta parca caracterização da população de leveduras isoladas os métodos morosos e fastidiosos que, até há relativamente pouco tempo, têm sido utilizados para identificar leveduras.

Existem nas metodologias normalmente usadas dois factores fundamentais que podem influenciar os resultados: a eficácia dos métodos de remoção física dos microrganismos do filopiano, e a adequação dos meios de cultura utilizados para o isolamento, que poderão favorecer algumas espécies e não ser apropriados para o crescimento de outras (Beech e Davenport 1971). Outros factores a ter em conta nas investigações sobre a biodiversidade

dos microrganismos colonizadores do filoplano, dependendo do objectivo em vista, são a definição das amostras a obter (tipo e localização das plantas, localização das folhas na copa, idade, etc.), colheita de folhas individuais ou mistura de várias folhas, tempo decorrido entre a recolha e o processamento das amostras, conservação das amostras antes do processamento, etc. (Donegan *et al.* 1991).

Além dos métodos tradicionais, que envolvem o isolamento e cultura dos microrganismos, os métodos moleculares, desenvolvidos mais recentemente, têm sido cada vez mais utilizados para o estudo da ecologia das populações microbianas. Torna-se particularmente interessante o estudo sobre a diversidade das populações colonizadoras do filoplano directamente no seu ambiente, sem necessidade de recorrer ao isolamento dos microrganismos em cultura pura. Uma possibilidade é a da detecção dos microrganismos através da amplificação de fragmentos de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando *primers* específicos. No entanto, estas metodologias têm a desvantagem de dificilmente serem quantitativas e de permitirem apenas a detecção dos microrganismos para os quais se utilizam *primers* específicos, para além de outros problemas associados à amplificação por PCR a partir de amostras naturais (Wilson 1997). Para obter o DNA dos microrganismos colonizadores do filoplano, terá de se proceder à sua separação física deste substrato (por lavagem das folhas, sonicação, etc.) e subsequente extracção de DNA a partir das células separadas, ou à extracção do DNA total das folhas e dos microrganismos a partir, por exemplo, da maceração das amostras. Esta última alternativa revela-se, no entanto, muito problemática (Bramwell *et al.* 1995), devido, por exemplo, à presença de compostos inibitórios da reacção de PCR. A este propósito, Bramwell *et al.* (1995) descreveram várias metodologias aplicáveis à extracção de DNA total de microrganismos colonizadores do filoplano.

Outra possibilidade é a de utilizar *primers* universais, com a subsequente separação e sequenciação dos fragmentos amplificados (Yang *et al.* 2001). Estes autores avaliaram a composição das comunidades microbianas presentes no filoplano de diversas plantas recorrendo a técnicas independentes de cultura. Os microrganismos foram lavados das folhas por sonicação e o seu DNA total extraído. Uma pequena região pertencente ao gene do rRNA 18S, com cerca de 230 bases, foi amplificada recorrendo a *primers* universais, e os fragmentos de DNA obtidos foram separados por eletroforese em gel desnaturante de gradiente (DGGE). Alguns destes fragmentos foram recolhidos, purificados e sequenciados. Entre as sequências obtidas, algumas eram idênticas a outras de bactérias já conhecidas e outras correspondiam a fungos, nomeadamente *A. pullulans*, conhecido colonizador do filoplano. No entanto, esta técnica apresenta limitações, nomeadamente o facto de apenas se poderem separar fragmentos com menos de 400 pb, porventura insuficientes para uma

correcta identificação dos microrganismos. Sequências muito semelhantes podem ainda formar uma banda única, para além de eventuais problemas associados à amplificação por PCR a partir das amostras naturais.

Uma outra metodologia recentemente desenvolvida, essencialmente para o estudo de comunidades bacterianas de diversos substratos, é a hibridação *in situ* (FISH – *Fluorescence In Situ Hybridisation*) com sondas de DNA fluorescentes (Ver Cap. V). Estas sondas podem ser mais ou menos específicas, hibridando com o rRNA de um só microrganismo, ou grupo de microrganismos-alvo, o que permite a sua detecção, quantificação e observação da distribuição espacial directamente no substrato, através de microscopia de epifluorescência e/ou laser confocal. Existem poucos relatos da utilização deste tipo de metodologia para o estudo de microrganismos no filoplano, e ainda menos para o estudo de fungos no mesmo habitat.

Brandl *et al.* (2001) utilizaram a hibridação *in situ* para verificar a identidade de uma determinada estirpe de *Erwinia herbicola*, entre células de outros microrganismos presentes, directamente na superfície de folhas de feijoeiro, onde se investigava o padrão espacial de expressão de um determinado gene por esta bactéria. Verificaram que, à superfície das folhas, células próximas apresentavam níveis de expressão do gene drasticamente diferentes, supondo-se que, apesar da sua proximidade, estas células se encontravam em condições microambientais muito diferentes, de que resultavam níveis de expressão variados. Morris *et al.* (1997) utilizaram técnicas de microscopia de epifluorescência, entre outras, com diversos corantes, como por exemplo laranja de acridina, para observar o que chamaram de biofilmes microbianos directamente na superfície de diversas folhas (oliveira, espinafre, etc.). A utilização da hibridação *in situ* com sondas de DNA fluorescentes foi também utilizada para o estudo do fungo leveduriforme *A. pullulans* directamente em folhas (Andrews *et al.* 2002, Li *et al.* 1997, Spear *et al.* 1999).

I.6. Objectivos do trabalho realizado e plano da dissertação

Os ecossistemas do tipo mediterrânico não têm sido investigados como habitat natural de populações microbianas em geral, e de leveduras em particular. Foi, assim, seleccionado um ecossistema de características mediterrânicas em Portugal, neste caso o Parque Natural da Arrábida. Foram recolhidas, ao longo de um período de dois anos, amostras de folhas de cinco plantas, com características distintas, representativas deste ecossistema: *Acer monspessulanum*, *Quercus faginea*, *Cistus albidus*, *Pistacia lentiscus* e *Osyris quadripartita*. Estas plantas estavam presentes em pelo menos um de dois locais de amostragem

localizados na Serra da Arrábida: Fonte do Veado e Mata do Solitário, com características microclimáticas diferentes. Um dos objectivos deste trabalho foi obter informações acerca da abundância, diversidade e variação sazonal das leveduras epifíticas no filoplano das plantas amostradas e averiguar a influência do microclima de cada local de amostragem, tipo de planta e estação do ano naquelas características. Procedeu-se a uma caracterização o mais completa possível das leveduras isoladas, para isso desenvolvendo e optimizando ferramentas e métodos que auxiliassem nessa caracterização.

Outro objectivo específico deste trabalho foi o de desenvolver e optimizar um método molecular, baseado na hibridação *in situ* com sondas de DNA fluorescentes, para a detecção, identificação e quantificação de leveduras presentes no filoplano sem necessidade de as cultivar em meios artificiais de laboratório.

O trabalho apresentado nesta dissertação reveste-se de especial importância no contexto dos estudos anteriores sobre a ocorrência de leveduras no filoplano (ver Tabela 1.1). De salientar a realização de estudos taxonómicos relativamente exaustivos com as leveduras isoladas, fazendo uso dos conhecimentos de sistemática mais recentes e de técnicas de identificação molecular. Além disso, as plantas amostradas e o tipo de ecossistema em que se inserem são desconhecidos em termos do tipo de leveduras colonizadoras que terão, eventualmente, propriedades específicas e com potencial importância de um ponto de vista biotecnológico. A aplicação de um método baseado na hibridação com sondas de DNA fluorescentes foi pela primeira vez realizada neste estudo das leveduras no filoplano, e poderá ser importante para o desenvolvimento de novas metodologias para a investigação destes fungos em outros ambientes, como por exemplo amostras clínicas ou industriais.

Esta dissertação divide-se em seis capítulos. No primeiro capítulo é feita uma introdução geral sobre ecologia de leveduras, o filoplano como habitat e a diversidade de métodos utilizados no estudo dos microrganismos colonizadores do filoplano, com especial ênfase em leveduras. O segundo capítulo incide sobre a ocorrência e distribuição das leveduras isoladas do filoplano das plantas seleccionadas da Serra da Arrábida. O terceiro capítulo é dedicado à identificação e taxonomia das leveduras isoladas e o quarto capítulo foca em características bioquímicas das mesmas leveduras. O quinto capítulo descreve aspectos relacionados com a aplicação do método FISH à identificação e detecção de leveduras directamente no filoplano. No sexto capítulo são feitas considerações finais e apresentadas perspectivas de trabalho futuro.

CAPÍTULO II

Ocorrência, diversidade e distribuição de leveduras isoladas do filoplano

Parte do trabalho apresentado neste capítulo foi publicado:

Inácio J., Pereira P., de Carvalho M., Fonseca Á., Amaral-Collão M. T., Spencer-Martins I. 2002. Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a Mediterranean-type ecosystem in Portugal. *Microb. Ecol.* **44**: 344-353.

II.1. Introdução

Neste estudo pretendeu-se apreciar a diversidade de leveduras presentes no filoplano de plantas representadas em ecossistemas do tipo mediterrânico. A região escolhida foi a da Serra da Arrábida, constituída por um conjunto de elevações que acompanham a vertente costeira meridional da península de Setúbal. O clima tem aqui características mediterrânicas, com uma estação quente e seca, o Verão, e outra fresca e húmida, o Inverno, intercaladas pelas duas estações intermédias, Primavera e Outono. A influência do Oceano Atlântico no clima desta região manifesta-se pela diminuição da amplitude térmica entre as duas estações extremas e pelo aumento da humidade atmosférica entre meados do Outono e meados da Primavera. Para uma revisão acerca da orografia, geologia, clima, solos e vegetação da Serra da Arrábida, ver Catarino *et al.* (1982) e Pedro (1991).

Foram, em primeiro lugar, seleccionadas as áreas a amostrar. A escolha recaiu sobre dois locais de características microclimáticas diferentes (Figura 2.1A): Fonte do Veado, mais húmido e temperado, localizado na encosta Norte, com um solo argiloso, rico em matérias orgânicas, negro e com pH ácido; e Mata do Solitário, mais seco, na encosta Sul, com solo mediterrânico vermelho ou amarelo, de calcários compactos e ácidos. As plantas a amostrar foram escolhidas a partir de uma visita preliminar à Serra da Arrábida, sendo representativas dos dois locais de amostragem: *Quercus faginea*, *Cistus albidus* e *Pistacia lentiscus*, presentes em ambos os locais; *Acer monspessulanum*, presente apenas na Fonte do Veado; e *Osyris quadripartita*, presente apenas na Mata do Solitário (Figura 2.1B). Pretendeu-se estudar a ocorrência, frequência e diversidade de leveduras no filoplano destas plantas, assim como a eventual influência do microclima de cada local de amostragem, tipo de planta e estação do ano naquelas características.

O isolamento e quantificação das leveduras a partir das folhas envolveram metodologias tradicionais, nomeadamente o plaqueamento de alíquotas das suspensões resultantes das lavagens das folhas, com a contagem subsequente de unidades formadoras de colónias, e o método SFM (*Spore-Fall Method*).

Para a análise da diversidade de espécies isoladas, comparando as várias plantas, locais e datas de amostragem, foram construídas curvas de rarefacção (ver p.e. Bills e Polishook 1994) que permitem comparar amostras para as quais o resultado do isolamento foi desigual, i.e. com um número muito variável de contagens totais. Para comparar a riqueza em espécies entre as várias amostras, utilizando as curvas de rarefacção, calculou-se o valor $E(s)$, que representa o número de espécies que seria esperado isolar se fossem

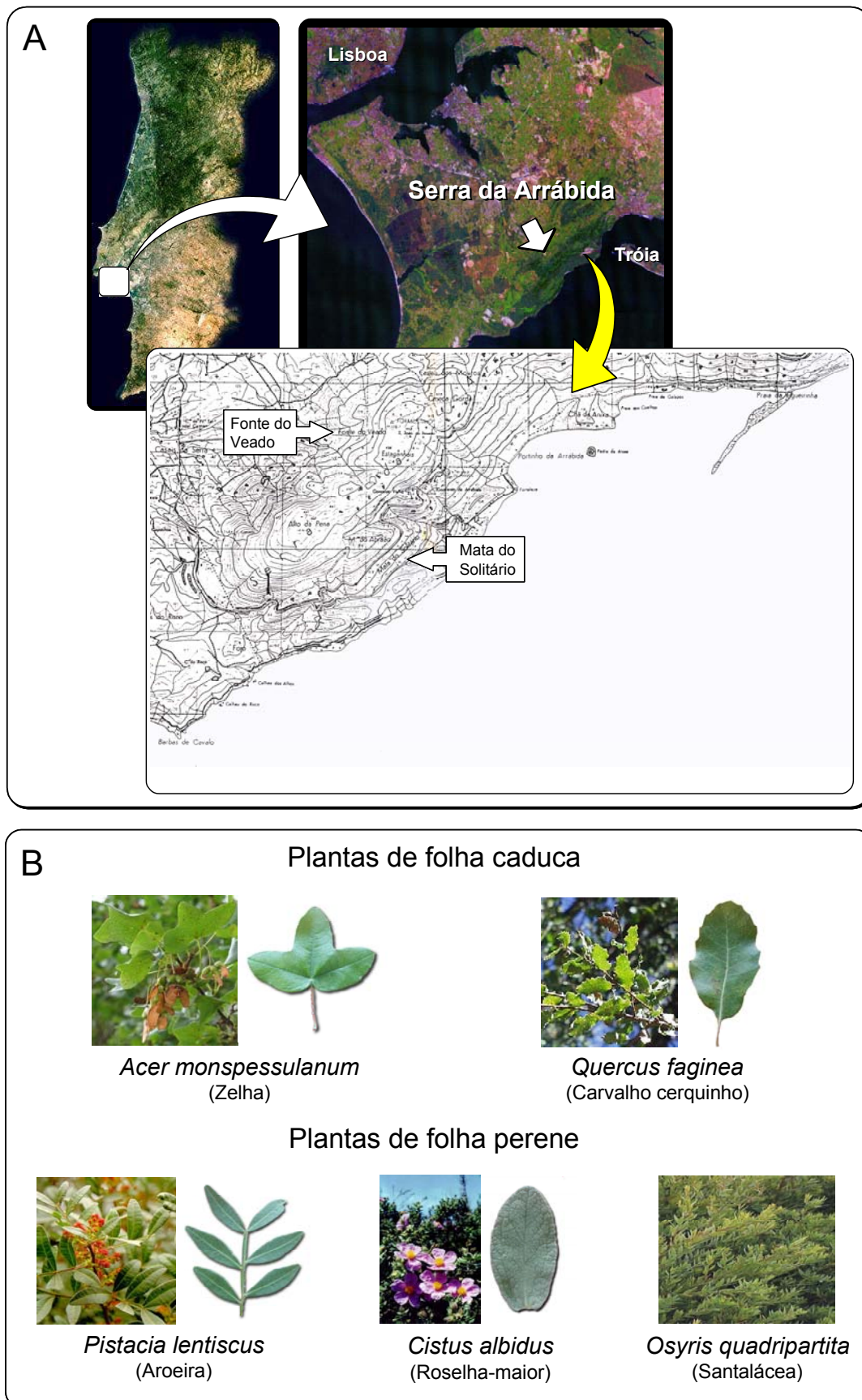


Figura 2.1. A - Localização da Serra da Arrábida no mapa de Portugal; **B** - Plantas seleccionadas para o estudo sobre as populações de leveduras no filoaplano.

recolhidas a partir das amostras n estirpes de uma população contendo um total de N indivíduos (Bills e Polishook 1994), valor que se obtém a partir da equação:

$$E(s) = \sum_{i=1}^s \left\{ 1 - \left[\frac{\binom{N-n_i}{n}}{\binom{N}{n}} \right] \right\} \quad (2.1)$$

em que n_i é o número de indivíduos pertencentes à i -ésima espécie, e s o número total de espécies encontradas. Uma curva de rarefacção em subida acentuada até ao número total de isolados poderá indicar que a amostra, leia-se o número de estirpes isoladas, foi muito pequena para caracterizar um determinado substrato (Bills e Polishook 1994), enquanto que uma curva com um declive a tender para a estabilização revela que foi isolado um número suficiente de estirpes para uma boa caracterização desse substrato (Hughes *et al.* 2001).

Na ecologia de organismos macroscópicos são muito utilizados para a comparação entre habitats e ecossistemas os chamados índices de biodiversidade, dos quais talvez o mais conhecido seja o de Shannon-Weaver (Ludwig e Reynolds 1988). Alguns autores adaptam este tipo de índices para estudos ecológicos com microrganismos, incluindo bactérias e fungos. No entanto, a sua utilização suscita alguma controvérsia. Hughes *et al.* (2001) referem que os métodos para avaliação da diversidade microbiana estão ainda em desenvolvimento, pois a aplicação dos índices de diversidade atrás referidos se torna impraticável quando se trata da análise das populações de microrganismos (Borneman *et al.* 1996), porque muitos não são cultiváveis e devido à dificuldade na sua identificação ao nível da espécie ou até do género (Watve e Gangal 1996). A definição de unidades básicas de diversidade microbiana é também muito difícil, e a determinação das abundâncias relativas das diversas populações pode ser muito ambígua e influenciada pelos métodos de estudo (Nübel *et al.* 1999).

Watve e Gangal (1996) propuseram a utilização de um índice de diversidade específico para o estudo das populações de microrganismos. Segundo estes autores, um bom índice de diversidade deve ter em atenção três factores: a riqueza em espécies, ou número de biotipos diferentes, a abundância relativa de cada um deles, e as diferenças, ou distâncias taxonómicas, entre cada biotipo. Tanto o índice de Simpson como o de Shannon-Weaver (Ludwig e Reynolds 1988) dão um peso suficiente às abundâncias relativas de cada espécie e à riqueza em espécies, mas falham no valor que atribuem às distâncias taxonómicas entre as espécies, os indivíduos, ou qualquer outra unidade apropriada. O índice de semelhança proposto por Watve e Gangal (1996) não requer a definição de qualquer espécie, pois é baseado na distância taxonómica média entre todos os pares de isolados, a qual geralmente aumenta com o número de biotipos distintos e diminui se um destes biotipos domina na

comunidade. Este índice não será aplicável, no entanto, pelo tempo e custos envolvidos, a estudos em que se isolem um número muito elevado de estirpes que necessitem de ser caracterizadas a fim de se determinar uma distância taxonômica entre elas.

Privilegiou-se, neste trabalho, o estudo de um maior número de plantas nos dois locais escolhidos da Serra da Arrábida, em vez de um estudo mais intensivo das populações de leveduras nas folhas de apenas uma ou duas plantas. Foi, assim, possível conseguir uma avaliação preliminar da diversidade e abundância destas populações no filoplano de diferentes plantas presentes num ecossistema do tipo mediterrânico. No entanto, esta opção deu origem a dados com menor significado estatístico, sendo no entanto possível apontar tendências sobre a diversidade e quantidade de leveduras, relativamente às estações do ano, plantas e locais de cada amostragem.

II.2. Material e Métodos

II.2.1. Locais de amostragem

Foram escolhidas duas áreas de amostragem na Serra da Arrábida (38°27' N, 9°02' W), localizada a Sul de Lisboa (Figura 2.1A), com condições microclimáticas distintas (ver Introdução deste capítulo): Fonte do Veado (38°28'50" N, 9°0'17" W; elevação de 300 m) e Mata do Solitário (38°27'55" N, 8°59'35" W; elevação de 50 m).

II.2.2. Plantas amostradas

Foram seleccionadas cinco espécies de plantas existentes na Serra da Arrábida (Figura 2.1B): *Q. faginea*, *Pi. lentiscus* e *Ci. albidus*, presentes nos dois locais amostrados; *Ac. monspessulanum*, que apenas se encontra na Fonte do Veado; e *O. quadripartita*, característica da Mata do Solitário. *Ac. monspessulanum* e *Q. faginea* são árvores de folha caduca, enquanto *Pi. lentiscus*, *O. quadripartita* e *Ci. albidus* são arbustos de folha perene.

II.2.3. Recolha das amostras

Foi realizada uma primeira amostragem, exploratória, em Março de 1997, tendo sido recolhidas amostras de folhas, flores, frutos e solo próximo de cada planta, em ambos os locais de amostragem seleccionados. Pretendeu-se, com esta amostragem, recolher amostras para a optimização das metodologias e escolha dos meios de cultura mais adequados. Nas amostragens seguintes, Novembro de 1997, Março e Novembro de 1998 e Março de 1999, foram recolhidas essencialmente amostras de folhas. Foi ainda realizada uma amostragem adicional em Junho de 1998, na qual apenas foram recolhidas folhas das plantas de folha caduca *Ac. monspessulanum* e *Q. faginea*.

As folhas foram colhidas aleatoriamente das mesmas plantas individuais (*Q. faginea*, *Ac. monspessulanum*, *Pi. lentiscus* e *O. quadripartita*) ou plantas contíguas (*Ci. albidus*), escolhendo folhas que não apresentassem sinais de infecção ou senescência de partes distintas. Um mínimo de 20 folhas de cada planta foram colhidas com pinça flamejada e imediatamente colocadas em sacos de polietileno previamente esterilizados, mantidos num recipiente refrigerado até processamento no laboratório após um período que nunca

excedeu as 4-5 horas. Algumas folhas foram colhidas e guardadas individualmente em placas de Petri estéreis, para isolamento de leveduras utilizando o método SFM.

II.2.4. Isolamento de leveduras

O isolamento de leveduras foi baseado em dois métodos: plaqueamento de alíquotas de suspensões resultantes das lavagens das folhas e, em complemento, o método SFM (*Spore-Fall Method*). No primeiro método, 1 g de folhas de cada planta (*Ac. monspessulanum*: ~ 10 folhas, *Q. faginea*: 4 - 6 folhas, *Ci. albidus*: 4 - 5 folhas, *Pi. lentiscus*: ~ 20 folhas e *O. quadripartita*: ~ 25 folhas) foi finamente cortado em pedaços com cerca de 10 × 10 mm, utilizando um bisturi estéril. Os pedaços foram colocados em 10 ml de solução de Ringer (NaCl 0,45% p/v), e a suspensão vigorosamente agitada em *vortex* durante 1 min. O sobrenadante foi diluído 10 a 10⁴ vezes, e alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram inoculadas por espalhamento, em duplicado, em placas de Petri contendo meio de cultura MYP (ver Apêndice I) com rosa de Bengala 0,004% (p/v) e cloramfenicol 0,05% (p/v).

As placas foram incubadas no escuro (o componente rosa de Bengala, sob o efeito da luz, liberta compostos inibitórios de crescimento), e à temperatura ambiente. Após 3, 5 e 7 dias, registou-se o número de colónias de leveduras em UFC/cm² de área da folha (incluindo, indiferenciadamente, as faces superior e inferior). Por vezes, a morfologia das colónias de *Aureobasidium* spp. e de outros fungos dimórficos assemelhava-se à apresentada pelas colónias de leveduras, dificultando as contagens. No entanto, com o prolongamento da incubação, essas colónias exibiam visivelmente micélio e/ou escureciam, distinguindo-se das formadas por leveduras. As contagens foram ainda dificultadas pela presença de fungos filamentosos, apesar do seu crescimento ser restringido pela incorporação de rosa de Bengala nos meios de cultura (Rose e Harrison 1987). O antibiótico cloramfenicol foi utilizado como inibidor do crescimento bacteriano.

Um mínimo de 20% do número total de colónias em cada placa foram recolhidas aleatoriamente, e purificadas em meio de cultura MYP (ver Apêndice I). As culturas com macromorfologia igual e recolhidas de uma mesma amostra foram consideradas como pertencendo à mesma estirpe/espécie de levedura. Uma estirpe representante de cada um dos grupos macromorfológicos foi mantida para caracterização subsequente. Fez-se uma quantificação relativa dos diferentes tipos de leveduras observados e, tendo em conta as contagens totais registadas para cada amostra, extrapolou-se para os valores das frequências de ocorrência de cada tipo de levedura nas folhas correspondentes (em

UFC/cm²). Para estas extrapolações foram utilizados os valores médios de área específica previamente determinados para cada uma das folhas amostradas.

Algumas folhas de cada planta foram ainda utilizadas para isolamento directo de leveduras através do método SFM. Para tal, cada folha foi fixada com fita cola no interior da tampa de uma placa de Petri contendo meio de cultura MYP, com a face superior voltada para o meio. Ao fim de cada período de 24 h, durante três dias, a tampa de cada placa foi transferida para nova placa com o mesmo meio de cultura. As colónias que iam surgindo, resultantes da descarga de balistoconídios sobre o meio de cultura, foram recolhidas e purificadas.

Os diferentes isolados foram mantidos em meio de cultura MYP – para basidiomicetas, ou YM (ver Apêndice I) – para ascomicetas, a 4 °C. As estirpes de levedura isoladas a partir das folhas foram designadas de acordo com o sistema apresentado na Figura 2.2.

II.2.5. Identificação das leveduras isoladas

Todas as leveduras isoladas foram sujeitas a uma caracterização preliminar descrita abaixo com vista à sua inclusão em grandes grupos taxonómicos. Para cerca de 30% dos isolados foi realizada uma identificação mais completa com base em métodos morfológicos e fisiológicos convencionais (Barnett *et al.* 2000, Yarrow 1998). Uma identificação molecular baseada na determinação das sequências da região D1/D2 do gene do rRNA 26S, e/ou da região ITS, foi realizada para cerca de 20% do número total de isolados, incluindo alguns dos isolados que tinham sido objecto de uma identificação fenotípica. Estas sequências foram comparadas com as existentes em bases de dados públicas (GenBank, NCBI, USA). As estirpes para as quais não foram determinadas as sequências de DNA e/ou realizados os testes de identificação completos foram identificadas por analogia, tendo em conta a origem da amostra e a semelhança fenotípica resultante da caracterização preliminar e/ou de perfis de bandas de DNA obtidas por MSP-PCR com as leveduras identificadas (Ver Cap. III).

Caracterização preliminar das leveduras isoladas

Foram realizados alguns testes fisiológicos preliminares, de modo a agrupar todas as leveduras isoladas com base em características mais relevantes, nomeadamente: reacção com o corante azul de diazónio B (teste do DBB – *Diazonium Blue B*), produção de urease, utilização de D-glucose, *myo*-inositol, D-glucuronato, eritritol e ácido protocatecuico como únicas fontes de carbono e energia, utilização de nitrato como única fonte de azoto e

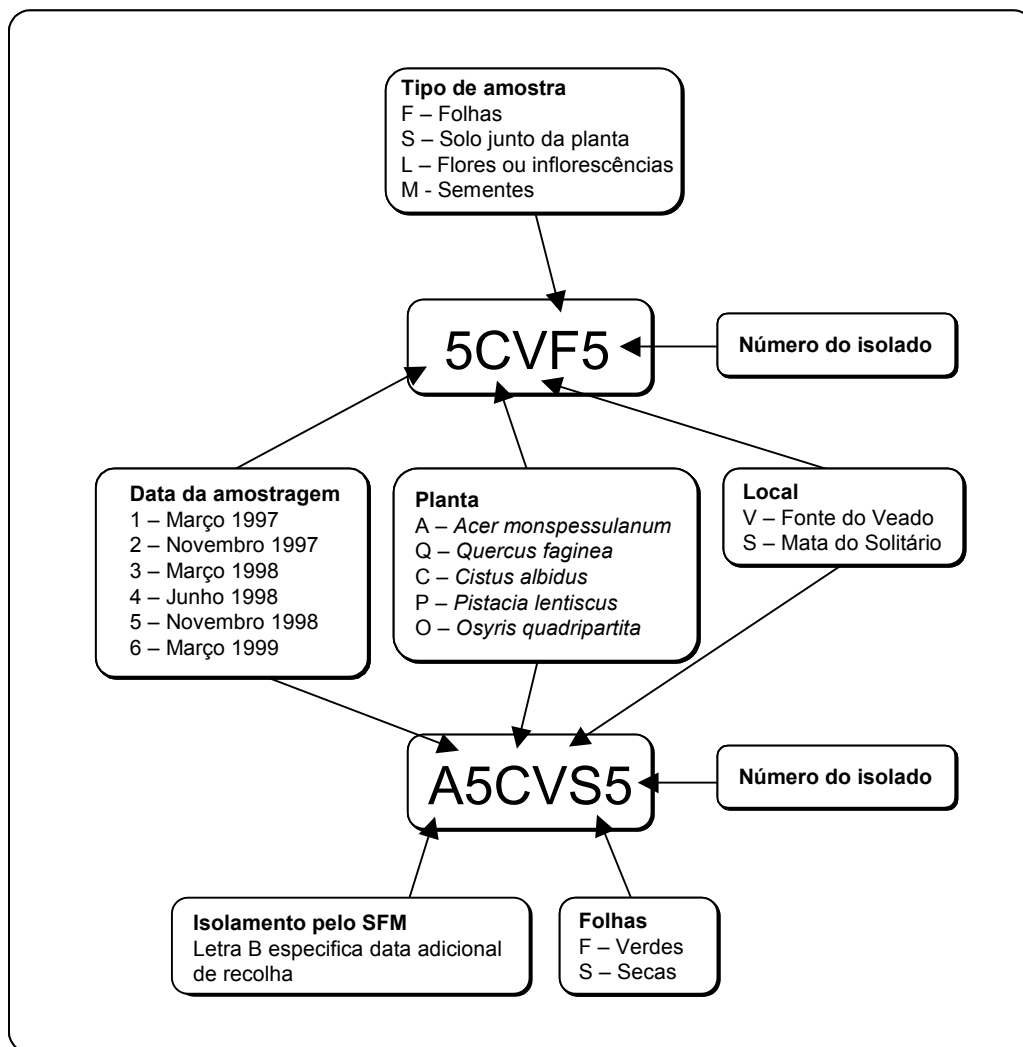


Figura 2.2. Código para a designação das estirpes isoladas.

pesquisa da produção de compostos amiláceos extracelulares (ver Cap. III, Tab. 3.1 e Tab. 3.2). As culturas foram ainda caracterizadas micro e morfologicamente, recolhendo-se informações acerca da textura e cor das suas colónias, produção de balistoconídios, forma das células, produção de micélio e/ou de estruturas sexuadas. Este procedimento permitiu diferenciar grandes grupos de isolados com base na semelhança do conjunto de características analisadas e conduziu, em alguns casos, a uma identificação rápida de estirpes que apresentavam características mais peculiares (p.e. os elementos do género *Lalaria*, ver Cap. III). Esta primeira fase resultou na selecção de leveduras para uma caracterização mais completa.

Caracterização morfológica

Foram registadas, para todas as leveduras que se pretendia identificar, as suas características macro e micromorfológicas (cor e textura das colónias, forma das células, formação de micélio ou pseudomicélio, tipo de gemulação, capacidade de produção de balistoconídios, produção de estruturas sexuadas – Yarrow 1998). O meio utilizado para o crescimento das culturas foi, geralmente, o meio MYP. Para a observação de balistoconídios, produção de micélio, realização de cruzamentos entre estirpes e pesquisa da produção de estruturas sexuadas, foram também utilizados os meios de cultura CMA e PDA (ver Apêndice I).

Caracterização fisiológica/bioquímica completa

Reacção com o corante azul de diazónio B (Teste do DBB)

Este teste permite a diferenciação entre as leveduras ascomicetas e basidiomicetas, devido a uma diferente reacção das culturas com o corante azul de diazónio B. As leveduras foram inoculadas em meio sólido MYP, e incubadas durante 2 – 3 semanas à temperatura ambiente. Adicionou-se, então, sobre as culturas uma solução de sal azul de diazónio B 0,1% p/v em Tampão Tris 0,25 M, pH7, preparada de fresco, e mantida em gelo até ser utilizada. Foi indicativo de afinidade basidiomiceta a mudança de cor da cultura (para castanho ou vermelho escuro), depois de 1 – 2 min à temperatura ambiente.

Hidrólise da ureia (produção de urease extracelular)

Este teste permite a diferenciação entre as leveduras ascomicetas (normalmente urease-negativas) e basidiomicetas (normalmente urease-positivas). A hidrólise da ureia aumenta a alcalinidade do meio de crescimento, mudando a cor do indicador de pH. Preparou-se o

meio com a composição: peptona 0,1% p/v, cloreto de sódio 0,5%, fosfato de potássio di-hidrogenado 0,2%, glucose 0,1% e vermelho de fenol 0,0012%, em água desmineralizada. O pH foi ajustado a 6,8 e adicionou-se agar 2%. Após esterilização em autoclave durante 15 min a 120 °C, adicionou-se 10% do volume final de uma solução 20% p/v de ureia, esterilizada por filtração, e distribuiu-se a mistura por tubos estéreis, deixando depois o meio solidificar em cunha. Os tubos foram inoculados com as culturas de leveduras, e incubados durante 5 – 7 dias à temperatura ambiente. Uma reacção positiva correspondeu à mudança da cor do meio de cultura para rosa/carmim.

Assimilação oxidativa de fontes de carbono e energia

Na pesquisa da capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono e energia utilizou-se o meio base *Yeast Nitrogen Base* (Difco) 0,67% p/v, suplementado com cada composto a testar, segundo Yarrow (1998). Salvo indicação em contrário (Tabela 2.1), todos os compostos foram testados à concentração final de 0,5% p/v.

Tabela 2.1. Compostos utilizados nos testes de assimilação para a identificação de leveduras

	Fontes de Carbono e Energia
HEXOSES	D-glucose; D-galactose; L-ramnose; L-sorbose
PENTOSES	D-xilose; D-ribose; L-arabinose; D-arabinose
DISSACÁRIDOS	sacarose; maltose; celobiose; trehalose; lactose; melibiose
TRISSACÁRIDOS	rafinose (1%); melezitose
POLISSACÁRIDOS	amido solúvel; inulina
ALCOÓIS	eritritol; ribitol (adonitol); D-manitol; <i>myo</i> -inositol; metanol; etanol; glicerol; galactitol (dulcitol); D-glucitol (sorbitol)
ÁCIDOS ORGÂNICOS	succinato; citrato; DL-lactato; L-malato; D-gluconato; D-glucuronato
GLICÓSIDOS	α -metil-D-glucósido; salicina
OUTROS COMPOSTOS	glucono- δ -lactona; D-glucosamina
	Fontes de Azoto
	nitrito; nitrito; cadaverina; etilamina; L-lisina, creatina; creatinina

Foram ainda realizados testes de assimilação de outros compostos, como fontes de carbono e energia, que não são tradicionalmente utilizados nos testes de identificação de leveduras (Sampaio e Fonseca 1995): os ácidos aldáricos L(+)-tartárico, D (-)-tartárico, *meso*-tartárico, L (-)-málico, mático e sacárico (à concentração de 0,25% p/v, em meio base *Yeast Nitrogen Base* (Difco) 0,67%, com pH ajustado a 3,8), os compostos aromáticos de baixo peso molecular ácidos protocatecuico, *p*-hidroxibenzóico, *m*-hidroxibenzóico, gentísico, vanílico, ferúlico, gálico, salicílico e verátrico, e ainda catecol e fenol (à concentração de 0,1% p/v, utilizando como meio base *Yeast Nitrogen Base* (Difco) 0,67%, com pH ajustado a 4,5).

Assimilação de fontes de azoto

Na pesquisa da capacidade de utilização de diferentes fontes de azoto (Tabela 2.1), utilizou-se o meio base *Yeast Carbon Base* (Difco) 1,17% p/v, suplementado com cada composto a testar, segundo Yarrow (1998).

Hidrólise de arbutina

A hidrólise da arbutina pela enzima β -glucosidase origina uma hidroxiquinona que produz uma cor castanha na presença de sais de ferro. As culturas foram inoculadas num meio de cultura com a composição: arbutina 0,5% p/v, extracto de levedura 0,5% e agar 1,5%, em água da torneira, suplementado com 0,2% v/v de uma solução estéril de citrato de amónio férrico 1% p/v.

Pesquisa da produção de compostos amiláceos

Após crescimento das culturas em meio líquido com *Yeast Nitrogen Base* (Difco) 0,67% p/v e glucose 0,5%, adicionou-se uma gota de soluto de Lugol (iodo 0,33% p/v e iodeto de potássio 0,66%, em água desmineralizada). O aparecimento de cor azul/violeta ou verde/acastanhado indicou um resultado positivo.

Crescimento em meio sem vitaminas

A detecção da capacidade de crescimento na ausência de vitaminas foi realizada utilizando o meio base *Vitamin Free Base* (Difco).

Crescimento na presença de 100 e 1000 ppm de cicloheximida

Foi testado o crescimento das leveduras em meios com *Yeast Nitrogen Base* (Difco) 0,67% p/v, glucose 1% e cicloheximida 100 e 1000 ppm.

Crescimento a diferentes temperaturas

O crescimento das leveduras foi testado a diferentes temperaturas de incubação (25, 30, 35, 37 e 40 °C), utilizando banhos termostatizados, em tubos com meio de cultura YM sólido.

Caracterização molecular

Extracção rápida de DNA genómico

Extraíu-se o DNA total das leveduras a caracterizar, utilizando um método de extracção rápido que, apesar de deixar o DNA relativamente impuro, é adequado para a amplificação por PCR. São adicionados num tubo *Eppendorf* (1,5 ml) 500 μ l de Tampão de Lise (Tris 50 mM; NaCl 250 mM; EDTA 50 mM; SDS 0,3% p/v, pH 8) e 200 μ l de esferas de vidro (425-

600 µm de diâmetro). Adiciona-se, com o auxílio de uma ansa, células de uma cultura da levedura com cerca de uma semana, crescida em meio sólido MYP, de modo a obter-se uma suspensão muito densa. Após agitação no *vortex*, à velocidade máxima, durante 3 min, os tubos são incubados durante 1 h num banho de água termostaticado a 65 °C. Após esta incubação, e nova agitação no *vortex* durante 3 min, os tubos são centrifugados durante 30 min (13 000 rpm, a 4 °C), o sobrenadante transferido para um novo tubo *Eppendorf*, e o DNA é precipitado durante 24 h a -20 °C, após adição de 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M e dois volumes de etanol absoluto a -20 °C. Após a precipitação, os tubos são centrifugados durante 20 min (13 000 rpm, a 4 °C), o DNA é lavado com 800 µl de etanol a 70% v/v, seco, ressuspendido em 50 µl de Tampão TE (Tris-HCl 100 mM, EDTA 100 mM, pH 8) e conservado a -20 °C. O DNA mantém-se estável nestas condições durante meses, ou anos. Para a utilização em reacções de PCR preparam-se alíquotas em água bidestilada, diluídas 1:2500.

Sequenciação da região D1/D2 do rDNA 26S e da região ITS

Para a amplificação da região D1/D2 do rDNA 26S e da região ITS, que compreende os espaçadores intergénicos ITS1 e ITS2 e o gene do rRNA 5.8S (Figura 2.3), começa-se por amplificar um fragmento de DNA com cerca de 1600 pb que contém as duas regiões, numa reacção de PCR utilizando os *primers* ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') e LR6 (5'-CGC CAG TTC TGC TTA CC-3') (Figura 2.3). O programa de amplificação consistiu num passo inicial de desnaturação a 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 64 °C e 2 min a 72 °C, com um passo de extensão final de 72 °C durante 5 min. Para algumas das estirpes de leveduras não foram obtidos produtos de amplificação utilizando este par de *primers*. Isso poderá dever-se, por exemplo, a uma não complementaridade destes com os seus alvos respectivos no DNA ribossómico. Uma alternativa será a utilização de outras combinações de *primers*, desde que o produto amplificado inclua as regiões a sequenciar.

Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados com o kit GFX PCR DNA – *Gel Band Purification* (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. O processo de sequenciação das regiões de interesse consistiu na realização de reacções separadas de PCR para cada par de *primers*: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') para a sequenciação da região ITS, e NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') e NL4 (5'-TCC-TCC-GCT TAT TGA TAT GC-3') para a sequenciação da região D1/D2, todos marcados com o fluorocromo Cy5 (Amersham Biosciences). A sequenciação da região D1/D2 e/ou da região ITS, utilizando estes pares de *primers* e usando como DNA-molde os fragmentos amplificados na reacção de PCR anterior, foi realizada utilizando o kit *Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle*

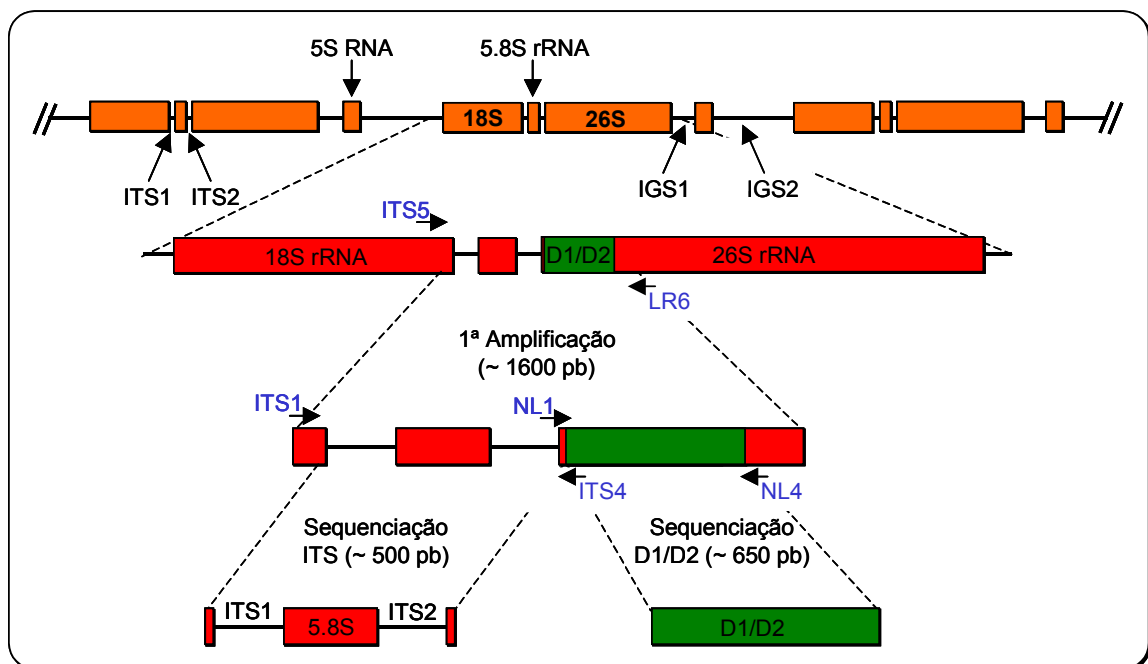


Figura 2.3. Esquema da organização mais frequente dos genes do rRNA na unidade de rDNA em leveduras, e localização da região D1/D2, região ITS e dos *primers* (indicados a azul) utilizados para a sequenciação das duas regiões (*Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA* – <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>).

Sequencing (RPN 2438/RPN2538, Amersham Biosciences) e um sequenciador automático ALF Express II (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. As sequências nucleotídicas das duas cadeias de DNA (sentido 5'→3' e 3'→5'), da região D1/D2 ou ITS1/5.8S/ITS2 (região ITS), são alinhadas entre si (uma é complementar da outra) utilizando o programa informático *Alfwin analyser* (Amersham Biosciences). São resolvidas as possíveis ambiguidades detectadas, obtendo-se no final deste processo sequências editadas que foram comparadas com as sequências equivalentes disponíveis em bases de dados públicas (GenBank).

II.2.6. Determinação do índice de Shannon-Weaver e construção das curvas de rarefacção

Foi determinado, para cada amostra (combinação de planta, local e data de amostragem), o índice de diversidade de Shannon-Weaver (D) (Ludwig e Reynolds 1988). Este índice dá uma medida do grau de incerteza na identificação de um determinado isolado, a partir de uma determinada amostra, e será tanto maior quanto maior for a diversidade da população presente na amostra. Este índice foi determinado a partir da equação:

$$D = - \sum (p_i \times \ln p_i) \quad (2.2)$$

em que p_i representa a abundância relativa da i -ésima espécie de levedura numa amostra.

Para a construção das curvas de rarefacção, que permitem comparar amostras quanto à riqueza de espécies de leveduras que nelas ocorrem, foi implementado um algoritmo em *Visual Basic* que simula um processo de amostragem aleatória. Fazendo referência à equação (2.1), referida na Introdução deste capítulo, faz-se corresponder N ao número total de estirpes isoladas a partir de uma determinada amostra, s ao número total de espécies encontradas, e n_i à abundância relativa de uma determinada espécie de levedura isolada dessa amostra.

II.3. Resultados e Discussão

Devido à sua extrema simplicidade e baixo custo, e apesar de bastante trabalhosas, as metodologias de isolamento tradicionais utilizadas neste trabalho, lavagem das folhas e SFM, constituíram um excelente ponto de partida para a realização de um estudo preliminar sobre as populações de leveduras nas folhas das plantas estudadas, permitindo o isolamento de centenas de estirpes, de espécies diversas, e uma quantificação aproximada das suas populações. Estas metodologias apresentam, no entanto, algumas limitações: a eficácia dos procedimentos utilizados para remover as células presentes no filoplano (no caso da lavagem das folhas), a possibilidade de espécies minoritárias passarem despercebidas (p.e com uma densidade abaixo dos níveis de detecção), e a composição dos meios de cultura laboratoriais utilizados para o isolamento (Andrews e Hirano 1991). Em relação à lavagem das folhas, Diriye *et al.* (1993) testaram a eficácia de vários métodos para a separação de células de leveduras a partir das folhas de alguns vegetais, entre outros substratos. Verificaram que a utilização de procedimentos mais agressivos, tais como uma agitação muito vigorosa ou a sonicação das amostras, se revelaram eficazes, permitindo o isolamento de uma maior variedade de espécies e o aumento das contagens totais de colónias em várias ordens de grandeza. Pela facilidade e rapidez de execução, a primeira destas metodologias foi adoptada para este trabalho. As lavagens têm, também, o inconveniente de remover os microrganismos depositados por casualidade na superfície das folhas e que não serão necessariamente colonizadores naturais destes substratos (Lee e Hyde 2002). Além disso, este procedimento, que envolve um corte fino das folhas, poderá ainda provocar o aparecimento de células de microrganismos endofíticos, mas consideramos que, a acontecer, o seu número não deve ser significativo.

As contagens de UFCs não foram, muitas vezes, consistentes entre as diluições e, por vezes, entre duplicados de uma mesma diluição, o que dificultou a extrapolação destes valores para a determinação das frequências. O método SFM é supostamente selectivo para o isolamento de leveduras produtoras de balistoconídios, mas verificou-se que muitas estirpes de levedura não produtoras deste tipo de estruturas eram também recolhidas, arrastadas, por exemplo, com a queda de partículas de poeira para o meio de cultura. Este método não é, no entanto, susceptível de quantificação.

Cerca de 90% das leveduras isoladas do filoplano neste trabalho (de um total de cerca de 850 estirpes) são de afinidade basidiomiceta, o que está de acordo com os resultados de outros autores em estudos de isolamento de leveduras noutras folhas (ver I.3). Em resultado da caracterização preliminar (ver Apêndice II) e do estudo taxonómico mais aprofundado dos isolados (ver Cap. III), observou-se que a maior parte das leveduras distribui-se pelos

seguintes grupos *sensu* Fell *et al.* (2000): Tremellales, Filobasidiales, Ustilaginomicetas, Microstromatales, Microbotryum e Erythrobasidium. Globalmente, os isolados representam pelo menos 67 espécies distintas. Destas, cerca de metade não parece corresponder a espécies conhecidas. Algumas destas espécies de leveduras são, na realidade, complexos de espécies muito próximas, como por exemplo *Erythrobasidium* cf. *hasegawianum* (ver III.3.2), ou simplesmente grupos de estirpes semelhantes e que não foram suficientemente caracterizadas para permitir a sua divisão em agrupamentos mais finos, como por exemplo *Cryptococcus* cf. *laurentii* (ver III.3.1). É concebível, portanto, que a riqueza em espécies, ou tipos de leveduras, presentes no filoplano das plantas estudadas seja superior à que é aqui inferida. Quase não foram isoladas leveduras ascomicetas e, entre estas, a grande maioria relaciona-se com um grupo peculiar, designado por fungos arquiascomicetas (ver III.3.4).

Na Figura 2.4 apresenta-se os resultados das contagens totais de leveduras no filoplano das várias plantas estudadas, para cada local e data de amostragem, e a percentagem relativa dos diversos grupos taxonómicos de leveduras isoladas (Ver Cap. III): Tremellales, Filobasidiales (que incluem maioritariamente *Cryptococcus* spp. não pigmentados), Urediniomicetas (que incluem maioritariamente *Rhodotorula* spp. e *Sporobolomyces* spp. pigmentadas), Ustilaginomicetas (principalmente *Rhodotorula bacarum*) e Arquiascomicetas, com a indicação do índice de biodiversidade de Shannon-Weaver. Num refinamento da figura anterior, a Figura 2.5 indica as espécies de leveduras isoladas a partir do filoplano das diversas plantas, dando uma ideia das respectivas frequências de ocorrência. Os nomes das espécies foram determinados com base numa análise combinada dos resultados da caracterização preliminar (ver Apêndice II), da identificação fenotípica completa (ver Apêndice III) e da identificação molecular, bem como nas análises taxonómicas mais aprofundadas descritas no Cap. III. Na Figura 2.5 é ainda indicado se uma determinada levedura foi isolada pelo método SFM. As curvas de rarefacção obtidas, em função dos resultados encontrados em termos de riqueza de espécies nas diferentes plantas e amostragens, são apresentadas na Figura 2.6. Estas curvas ilustram algumas das tendências observadas.

Algumas das espécies de leveduras foram isoladas a partir da maioria das folhas, independentemente da planta, local e data de amostragem (Figura 2.5), como por exemplo *Cr.* cf. *laurentii*, *Ery.* cf. *hasegawianum*, *Rh.* cf. *slooffiae*, *Sporobolomyces* cf. *roseus*, *Rh. bacarum*, *Tilletiopsis* spp. e *L. inosiphila* sp. nov.. Também isoladas de várias folhas, mas com uma distribuição aparentemente menos ampla, aparecem espécies como *Sp. coprosmae*, *Sporobolomyces* sp. nov. 1, *Sporobolomyces* sp. nov. 2, *Sp. gracilis* e *Rhodotorula* sp. nov. 4 (Figura 2.5). As elevadas frequências de ocorrência apresentadas por algumas destas espécies nas folhas de onde foram isoladas, assim como a sua

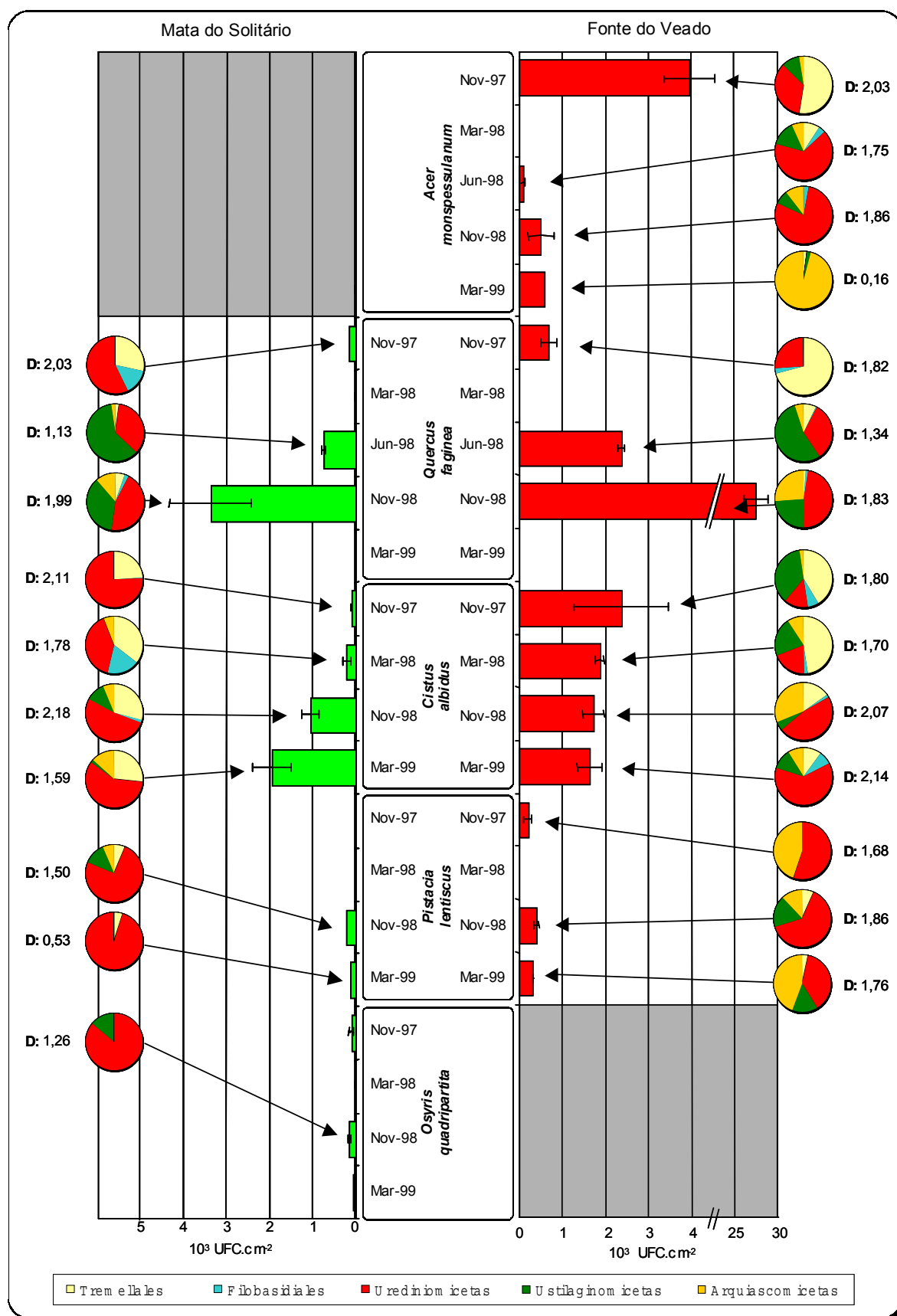


Figura 2.4. Contagens totais de leveduras no filoplano das plantas amostradas, para cada data de amostragem. São ainda indicadas as proporções dos diferentes tipos de leveduras isoladas de cada planta, assim como o índice de diversidade de Shannon-Weaver (D). As barras de erro representam os desvios padrão das densidades médias. Zonas sombreadas: a planta respectiva não ocorre no local indicado.

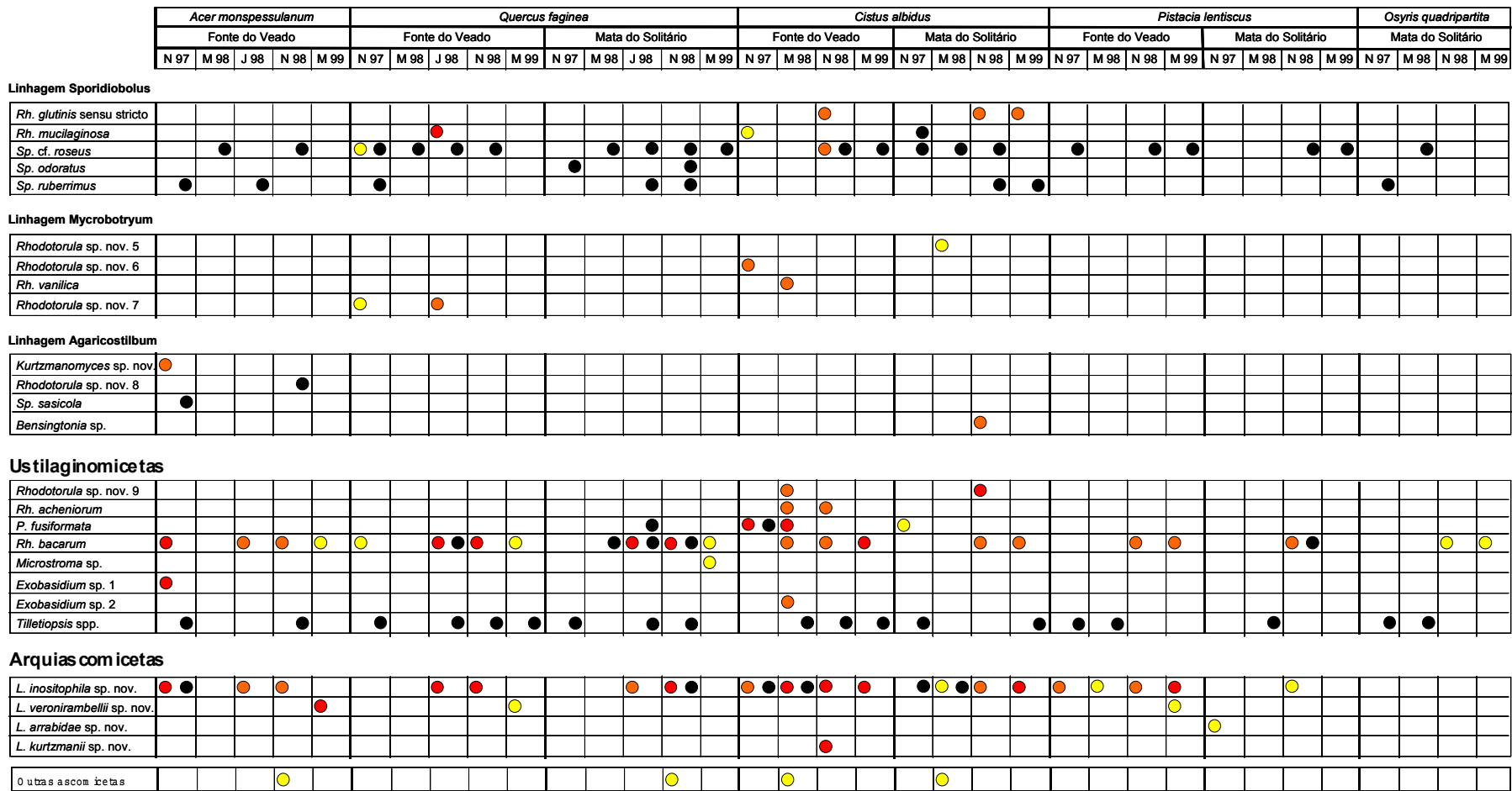


Figura 2.5. Frequência relativa da ocorrência das diferentes espécies de leveduras no filo plano das plantas amostradas, de acordo com o local e data de amostragem (M – Março, J – Junho, N – Novembro). ●, < 10¹ UFC.cm⁻²; ●, 10¹ – 10² UFC.cm⁻²; ●, > 10² UFC.cm⁻²; ● leveduras isoladas pelo método SFM.

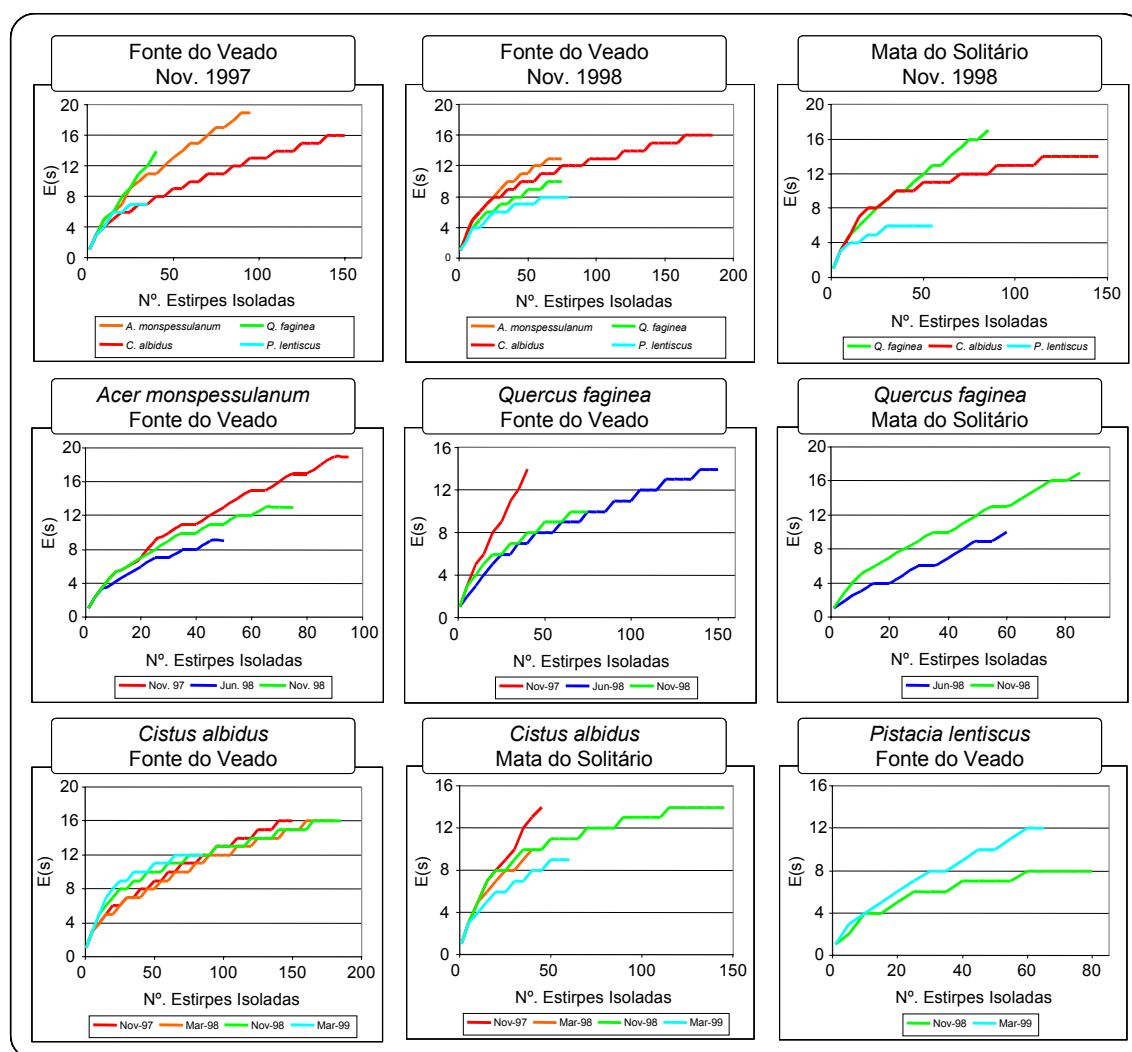


Figura 2.6. Curvas de rarefacção ilustrativas de tendências em termos de riqueza em espécies de leveduras, em diferentes plantas e alturas do ano.

ubiquidade neste tipo de substrato, sugerem que estas leveduras estejam particularmente adaptadas à colonização do filoplano, o que está de acordo com estudos anteriores que indicam uma certa inespecificidade das leveduras do filoplano relativamente à planta colonizada (Last e Price 1969).

Particularmente interessante foi a ocorrência frequente de *Ery. cf. hasegawianum*, *Rh. bacarum* e *L. inositophila* sp. nov., espécies que não são habitualmente reconhecidas como importantes colonizadores das folhas. O isolamento de um grande número de *Lalaria* spp., principalmente de *L. inositophila* sp. nov., foi inesperado, uma vez que estão filogeneticamente relacionadas com o fungo fitopatogénico *Taphrina* que raramente é isolado a partir de folhas sem sintomas de infecção (Kramer 1987) (ver III.3.4).

Algo surpreendente foi a baixa incidência de leveduras produtoras de balistoconídios isoladas utilizando o método de lavagem das folhas. No entanto, este tipo de leveduras estava presente nas folhas, como veio a revelar a utilização do método SFM (Figura 2.5). Esta observação é ainda mais nítida no caso do isolamento de *Sp. cf. roseus*, *Sp. ruberrimus* e do fungo dimórfico *Tilletiopsis*. Esta dificuldade no isolamento de leveduras balistoconidiogénicas com o método de lavagem das folhas poderá ser atribuída a uma baixa concentração destas leveduras no filoplano e/ou a uma ineficiência da lavagem para separar as suas células da superfície das folhas.

Várias espécies de leveduras foram isoladas ocasionalmente, como por exemplo *Cryptococcus* sp. nov. 2, *Cryptococcus* sp. nov. 4, *Cryptococcus* sp. nov. 11, *Rhodotorula* sp. nov. 8 (Figura 2.5). Estas observações, e uma vez que não ressalta uma associação específica com determinada planta, sugerem uma certa raridade de ocorrência destas espécies nestes substratos.

Varição espacial (Fonte do Veado vs. Mata do Solitário)

Para as espécies de plantas presentes em ambos os locais de amostragem (*Q. faginea*, *Ci. albidus* e *Pi. lentiscus*) observou-se que, de uma maneira geral, as dimensões das populações de leveduras nos respectivos filoplanos são superiores na Fonte do Veado, em relação à Mata do Solitário (Figura 2.4), com a exceção de *Ci. albidus* para a amostragem de Março de 1999. Esta tendência foi também observada para as frequências de fungos filamentosos no filoplano destas mesmas plantas, num trabalho realizado, em paralelo com o apresentado nesta dissertação, por outro grupo de investigação (Pereira *et al.* 2002). Estes resultados poderão ser explicados pelo microclima mais húmido existente na Fonte do

Veado, em comparação com o ambiente mais exposto, árido e seco da Mata do Solitário. Esta hipótese estaria de acordo com observações semelhantes de outros autores, que referem um impacto positivo de elevados níveis de humidade na dimensão das populações microbianas presentes no filoplano (Bashi e Fokkema 1977, Kinkel 1997).

Os resultados parecem indicar que, apesar de tendencialmente as dimensões da população de leveduras no filoplano das plantas da Fonte do Veado serem superiores às das plantas equivalentes na Mata do Solitário, a riqueza em espécies não acompanha esta tendência (Figura 2.5). É possível que o aumento das frequências na Fonte do Veado se deva, na maior parte dos casos, ao desenvolvimento de populações de algumas espécies de leveduras dominantes, melhor adaptadas às condições ambientais que aqui encontram, e não ao desenvolvimento de muitas espécies representadas por um número mais reduzido de indivíduos. Esta hipótese, a verificar-se, teria implicações em termos do índice de biodiversidade de leveduras nas folhas destas plantas, que terá um valor menor se um ecossistema é dominado por poucas espécies. Quando se comparam os valores do índice de biodiversidade de Shannon-Weaver, estes são geralmente superiores na Mata do Solitário em relação à Fonte do Veado para espécies de leveduras no filoplano de *Q. faginea* e de *Ci. albidus*, exceptuando os casos de *Q. faginea* na amostragem de Junho de 1998 e de *Ci. albidus* na amostragem de Março de 1999 (Figura 2.4). De notar que na amostragem de Março de 1999 se obteve para *Ci. albidus* um número superior de leveduras isoladas na Mata do Solitário.

Nas folhas de *Pi. lentiscus* foram, geralmente, encontradas frequências relativas mais baixas de leveduras na Fonte do Veado e na Mata do Solitário (Figura 2.4), assim como uma menor riqueza em espécies (Figura 2.5).

Na Figura 2.7 é possível comparar as frequências das espécies de leveduras isoladas, na amostragem de Novembro de 1998, do filoplano das plantas presentes simultaneamente na Fonte do Veado e da Mata do Solitário (*Q. faginea*, *Ci. albidus* e *Pi. lentiscus*). Verifica-se que, de uma maneira geral, as espécies mais abundantes são consistentemente isoladas de folhas das plantas nos dois locais, mas as respectivas frequências são normalmente superiores na Fonte do Veado. Observa-se ainda que certas espécies predominam em cada uma das comunidades analisadas (por exemplo, espécies como *Ery. cf. hasegawianum*, *Rh. cf. slooffiae* e *Cryptococcus* sp. nov. 1 - no caso de *Ci. albidus*). Não foram detectados casos de espécies de leveduras que aparecessem sistematicamente em plantas localizadas em apenas um dos dois locais de amostragem.

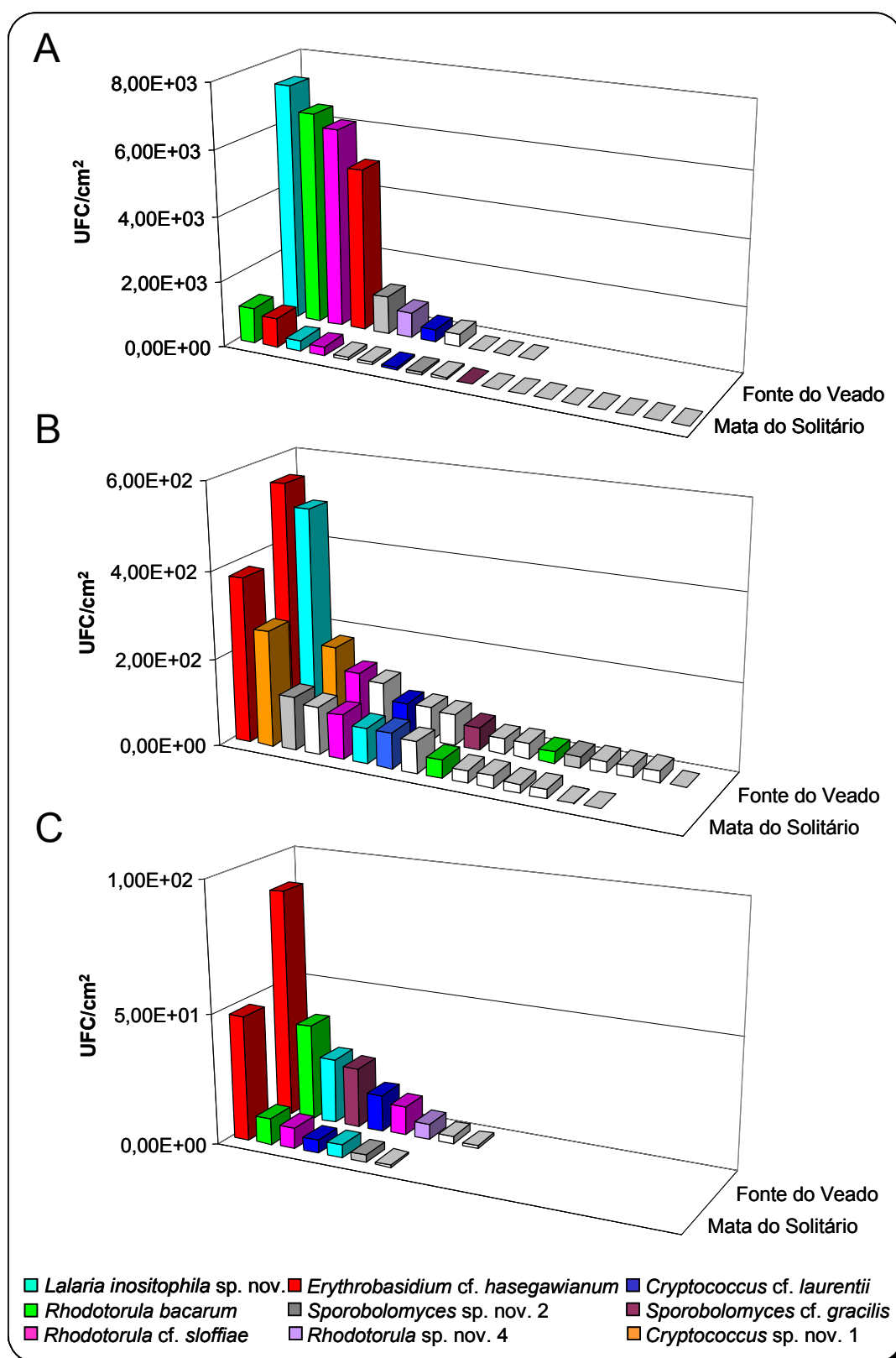


Figura 2.7. Distribuição das frequências das diferentes espécies de leveduras no filoplane das plantas estudadas (A – *Quercus faginea*, B – *Cistus albidus* e C – *Pistacia lentiscus*), na amostragem de Novembro de 1998. Apenas estão indicadas a cores as espécies mais abundantes (vide Fig. 2.5).

Variação sazonal

Comparando os resultados obtidos nas amostragens realizadas em diferentes estações do ano (Figura 2.4), parece haver um aumento da Primavera para o Outono do número de leveduras presentes nas folhas das plantas de folha caduca *Ac. monspessulanum* e *Q. faginea*, acompanhando o seu desenvolvimento. Para estas plantas, nas amostragens realizadas na Primavera o número de isolados foi muito reduzido, com excepção da amostragem de *Ac. monspessulanum* em Março de 1999 na Fonte do Veado (Figura 2.4). No entanto, e como se pode observar na Figura 2.4, este valor anormalmente elevado é, quase na totalidade, devido à presença nas folhas de uma única espécie de levedura pertencente ao grupo dos Arquiascomicetas, sendo desconhecida a razão desta excepcional abundância. Esta levedura apenas foi detectada em tão grande quantidade nas folhas desta planta, e não nas folhas de *Q. faginea*, por exemplo, localizada a poucos metros de *Ac. monspessulanum*. Durante o ano de 1998 observou-se um crescendo da dimensão das populações de leveduras de Março para Novembro nas folhas de ambas as plantas amostradas (Figura 2.4). Esta tendência também se observou nas populações de fungos filamentosos isolados na mesma altura (Pereira *et al.* 2002) e está em concordância com os resultados de outros estudos de microrganismos (Breeze e Dix 1981, Fokkema e Schippers 1986, Hogg e Hudson 1966, Last e Price 1969), sendo normalmente explicada pelo aumento de exsudados com o envelhecimento da folha, e por uma menor produção de compostos antifúngicos.

Ao analisarmos os valores absolutos do número de isolados em amostragens realizadas no mesmo mês em dois anos consecutivos (1997 e 1998), nas árvores de folha caduca, verificou-se que houve uma grande variação que chegou, por exemplo em Novembro, a uma ordem de grandeza (Figura 2.4). Curiosamente, a relação era invertida nas duas plantas amostradas, i.e. em *Q. faginea* a densidade encontrada aumentou de 1997 para 1998 enquanto em *Ac. monspessulanum* diminuiu.

Em relação às plantas de folha perene, não foi aparente uma variação sazonal. Por exemplo, em *Ci. albidus* na Fonte do Veado foram observadas densidades populacionais muito semelhantes entre 1997 e 1999, enquanto na Mata do Solitário a dimensão da população de leveduras foi crescendo continuamente durante o mesmo período de amostragem (Figura 2.4). Já em relação aos fungos filamentosos, Pereira *et al.* (2002) observaram uma maior frequência destes em *Ci. albidus* nas amostragens realizadas no Outono, em relação às amostragens da Primavera. É de salientar que nas diferentes amostragens foram sempre recolhidas folhas com a mesma idade aparente.

Também em relação à diversidade de espécies nas plantas de folha caduca, *Ac. monspessulanum* e *Q. faginea*, se verificou uma tendência para aumento nas amostragens realizadas no Outono em relação à amostragem de Junho, no início do Verão (Figura 2.6). Por exemplo, para *Q. faginea* na Mata do Solitário (Figura 2.6) o valor de $E(s)_{60}$, o número de espécies que seria esperado recolher se fossem isoladas 60 estirpes a partir de cada amostra, é igual a 10 espécies em Junho e 13 em Novembro. Este aumento do número de espécies parece acompanhar o aumento das contagens totais de leveduras nestas folhas da Primavera para o Outono. Surpreendente é a forma da curva de rarefacção simulada para *Q. faginea* na Fonte do Veado com base nos dados obtidos em Novembro de 1997 (Figura 2.6). Não indicia estabilização, sugerindo que não foram recolhidos indivíduos bastantes a partir desta amostra para uma caracterização suficiente das espécies colonizadoras (ver Introdução deste capítulo).

Em relação a *Ci. albidus*, amostragens da Fonte do Veado originaram resultados relativamente homogéneos, enquanto que se observaram algumas diferenças entre as amostragens realizadas na Mata do Solitário (Figura 2.6), com uma tendência para o isolamento de um maior número de espécies nas amostragens realizadas em Novembro. Apesar do número de isolados a partir das folhas de *Pi. lentiscus* e *O. quadripartita* ter sido sempre mais reduzido e com menos espécies representadas (Figura 2.5), surgiu uma maior riqueza relativa de espécies na amostragem de Março de 1999 em *Pi. lentiscus* na Fonte do Veado (Figura 2.6).

É de realçar que nos estamos sempre a referir a diferenças, entre as várias amostras, de duas, três ou quatro espécies, num total que raramente ultrapassa as 15 espécies isoladas. Não se detectou qualquer sucessão sazonal das espécies encontradas para uma mesma planta amostrada.

Variação com a espécie de planta

Como já foi referido, as folhas de *Ac. monspessulanum*, *Q. faginea* e *Ci. albidus*, pelo menos em determinadas alturas do ano, apresentaram as populações mais abundantes de leveduras, enquanto em *Pi. lentiscus* e *O. quadripartita* as leveduras ocorriam consistentemente em menor número. Em analogia com os resultados obtidos para leveduras, foram sempre detectadas densidades relativamente baixas de fungos filamentosos nas folhas de *Pi. lentiscus* e *O. quadripartita* (Pereira *et al.* 2002). A presença de compostos inibitórios do crescimento microbiano na superfície das folhas destas duas plantas poderia, em parte, explicar a reduzida carga de leveduras colonizadoras. De realçar

que *Pi. lentiscus* é uma planta conhecida pelas suas actividades antimicrobianas, sendo muito utilizada na medicina popular (Ali-Shtayeh *et al.* 1998). Não constituiu, no entanto, um objectivo deste trabalho o estudo destes aspectos das plantas amostradas. As quantidades totais de leveduras no filoplano das plantas estudadas são dificilmente comparáveis com os valores obtidos noutros programas de isolamento, com outras plantas, uma vez que nesses estudos o fungo dimórfico ubíquo *Aureobasidium pullulans* foi muitas vezes contabilizado como parte da população de leveduras (Breeze e Dix 1981, Jager *et al.* 2001). No entanto, densidades da ordem de 10^2 a 10^4 UFC.cm⁻² são comuns (Last e Price 1969). Neste trabalho foram encontrados valores muito variáveis, desde 10^1 UFC.cm⁻², obtidos em *Pi. lentiscus* e *O. quadripartita*, até valores da ordem de 10^4 UFC.cm⁻², obtido numa das amostragens de *Q. faginea* (Figura 2.4).

Apesar da aparente ubiquidade das leveduras predominantes no filoplano das plantas amostradas, foram registados casos de distribuição restrita de algumas espécies: p.e. *Cryptococcus* sp. nov. 1 foi isolado com uma frequência relativamente elevada unicamente a partir de folhas de *Ci. albidus* (Figura 2.5), tanto na Fonte do Veado como na Mata do Solitário, e em várias amostragens. Também apenas isoladas das folhas desta planta, mas de uma maneira menos consistente, encontramos as espécies *Cryptococcus* sp. nov. 5, *Filobasidium* sp. nov. e *Rhodotorula acheniorum*, entre algumas outras (Figura 2.5). A planta em questão apresenta uma população de leveduras relativamente numerosa e diversa, o que poderá ser consequência da densa camada de tricomas à superfície das suas folhas (Andrews e Hirano 1991). São necessários, no entanto, mais isolamentos a partir das folhas da mesma planta, em outros locais, para avaliar a possível especificidade por parte de algumas leveduras basidiomicetas em relação às folhas de *Ci. albidus*.

Em termos de riqueza em espécies não se podem apontar tendências nítidas. A curva de rarefacção relativa a Novembro de 1997 para *Pi. lentiscus* parece estabilizar mais rapidamente, enquanto que com o aumento do número de estirpes isoladas se continua a encontrar muitas espécies distintas a partir das folhas de *Ci. albidus* (Figura 2.6). Esta tendência foi também observada na amostragem de Novembro de 1998 na Mata do Solitário (Figura 2.6). Em relação a esta última amostragem, mas na Fonte do Veado, verificou-se a seguinte ordem decrescente de riqueza de espécies nas respectivas folhas: *Ac. monspessulanum* > *Ci. albidus* > *Q. faginea* > *Pi. lentiscus*.

Apesar da riqueza em espécies ser aparentemente superior em *Ac. monspessulanum*, *Q. faginea* e *Ci. albidus*, quando comparadas com *Pi. lentiscus* e *O. quadripartita*, nas amostragens de Outono os valores do índice de diversidade de Shannon-Weaver não acompanham de uma maneira consistente este aumento (Figura 2.4), indicando que a

maioria dos indivíduos destas populações poderá representar um número restrito de espécies dominantes. A Figura 2.7 permite observar que nas folhas de *Q. faginea* e *Ci. albidus* as frequências de ocorrência mais elevadas estão, geralmente, associadas a algumas espécies ubíquas, como por exemplo *L. inositophila* sp. nov., *Rh. cf. slooffiae*, *Ery. cf. hasegawianum* e *Cryptococcus* sp. nov. 1 (esta última apenas nas folhas de *Ci. albidus*). A maioria das restantes espécies, muitas possivelmente correspondendo a espécies não reconhecidas, apresentam frequências de ocorrência reduzidas. As populações de leveduras nas folhas de *Pi. lentiscus*, apesar de apresentarem dimensões inferiores, parecem também incluir espécies dominantes, como por exemplo *Ery. cf. hasegawianum*.

CAPÍTULO III
Caracterização taxonómica dos isolados

III.1. Introdução

Algumas leveduras isoladas na primeira fase deste trabalho foram seleccionadas para a realização de estudos taxonómicos mais aprofundados, utilizando diversos métodos. Nesta introdução resume-se a classificação actual das leveduras, com um especial ênfase nas de afinidade basidiomiceta dada a sua maior abundância relativa no habitat estudado. Esta classificação é, modernamente, baseada, em grande parte, em critérios de ordem filogenética, embora integre as várias características conhecidas para um dado organismo.

Como já foi referido no Capítulo I, as leveduras constituem um grupo de microrganismos integrado no Reino Fungi e compreendem representantes dos Filos Ascomycota (leveduras ascomicetas) e Basidiomycota (leveduras basidiomicetas). Para além das estruturas sexuadas (ascos nos ascomicetas e basídios nos basidiomicetas), outras características, fisiológicas, bioquímicas e moleculares (Tabela 3.1), permitem a distinção entre leveduras ascomicetas e basidiomicetas. Estas características são particularmente importantes na classificação dos géneros anamórficos, para os quais não se conhece a fase sexuada do respectivo ciclo de vida.

Tabela 3.1. Características gerais das leveduras ascomicetas e basidiomicetas

	Leveduras ascomicetas	Leveduras basidiomicetas
Parede celular	Duas camadas	Multilamelar
Conidiogénese	Holoblástica	Enteroblástica
Polissacáridos dominantes na parede celular	Mananos; Glucanos	Quitina
% Mol G + C	30 – 55%	45 – 70%
Ubiquinona (número de sub-unidades de isopreno)	5 - 9	8, 9, 10, 10(H ₂)
Pigmentação das culturas (laranja, rosa, vermelho)	Normalmente sem pigmentação	Presente em muitas espécies
Produção de balistoconídios	-	Presente em algumas espécies
Produção de DNAses extracelulares	-	+
Produção de urease extracelular	- ou fraca	+
Reacção com o corante azul de diazónio B	- ou fraca	+

III.1.1. Noções sobre classificação de leveduras

Classificação das leveduras ascomicetas

Análises filogenéticas das sequências nucleotídicas do RNA ou DNA ribossómicos de fungos filamentosos e leveduras mostraram que os ascomicetas se dividem em três linhagens (Figura 3.1) (Barns *et al.* 1991, Bruns *et al.* 1991, Nishida e Sugiyama 1993,

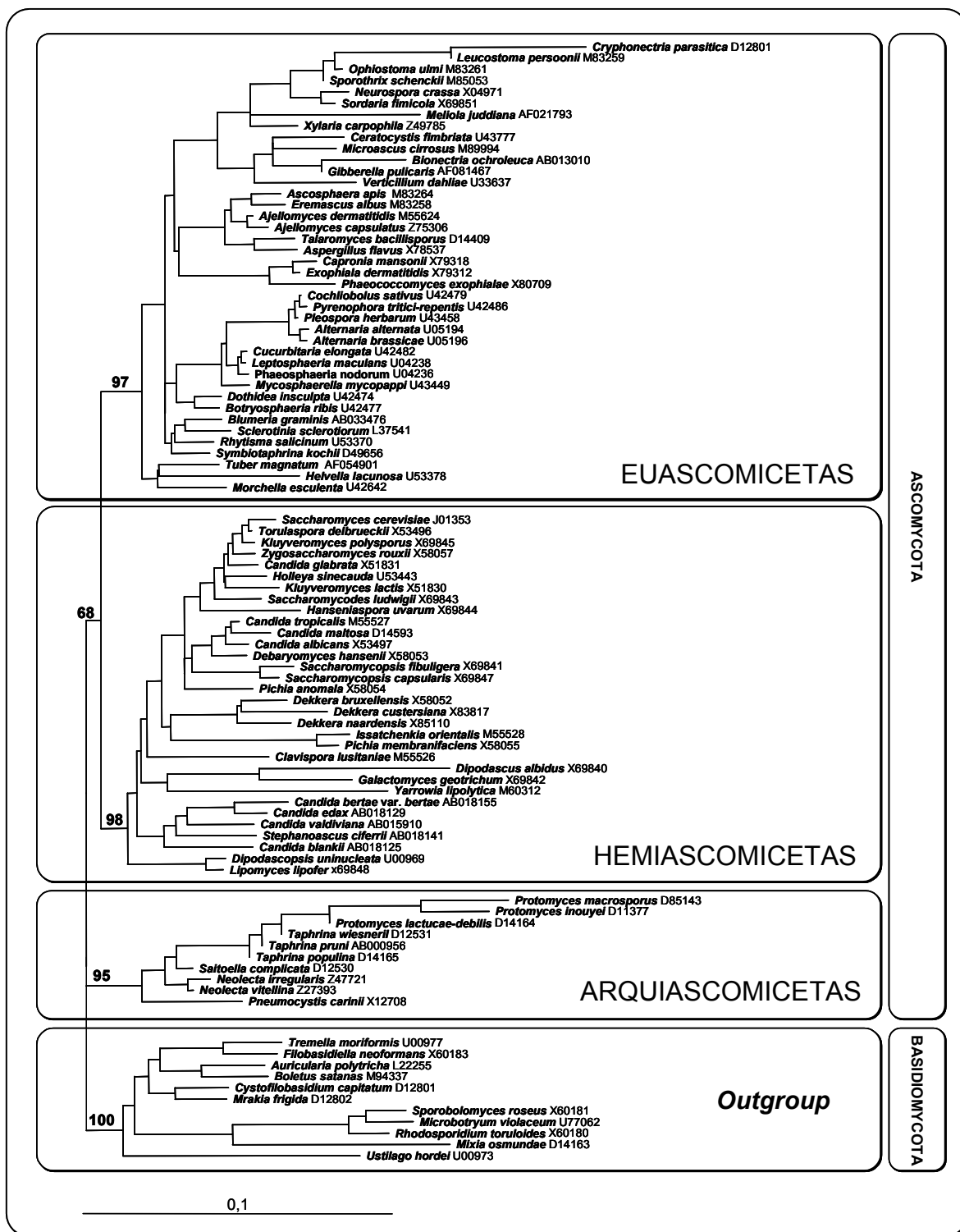


Figura 3.1. Árvore filogenética baseada na análise da sequência nucleotídica do gene do rRNA 18S de 93 espécies de fungos, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições, estando apenas indicados os valores obtidos para a formação de grandes grupos. A escala representa o número de substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente.

Walker 1985, Wilmotte *et al.* 1993): Euascomicetas (maioritariamente fungos filamentosos e alguns dimórficos, em que quase todas as espécies produzem corpos frutíferos), Hemiascomicetas (um grupo monofilético, constituído quase inteiramente por leveduras) e um grupo relativamente heterogêneo, contendo géneros como *Neolecta*, *Taphrina*, *Protomyces*, *Saitoella* e *Pneumocystis*, designado de Arquiascomicetas por Nishida e Sugiyama (1993).

Classificação das leveduras basidiomicetas

Entre os fungos basidiomicetas são, tradicionalmente, reconhecidos dois grandes grupos: os Heterobasidiomicetas e os Homobasidiomicetas. Nos primeiros, os basidiósporos podem germinar por gemulação, produção de balistoconídios, microconídeos ou tubos de germinação, enquanto que nos segundos os basidiósporos germinam apenas pela formação de hifas. As leveduras basidiomicetas fazem parte do grupo mais diversificado dos Heterobasidiomicetas (Fell *et al.* 1992, Guého *et al.* 1993, Swann e Taylor 1995), tendo sido incluídas por Swann e Taylor (1995) em três classes - Urediniomicetas, Ustilaginomicetas e Himenomicetas - que também contêm espécies de fungos filamentosos. As leveduras basidiomicetas são, assim, polifiléticas, com a consequente heterogeneidade nos seus ciclos de vida e ultraestrutura, entre outras características (Fell *et al.* 2001).

Fell *et al.* (2000, 2001) e Scorzetti *et al.* (2002) realizaram uma análise filogenética das sequências das regiões D1/D2 e ITS do rDNA da maioria das espécies de leveduras basidiomicetas descritas, tendo confirmado a sua distribuição pelas classes de fungos Urediniomicetas, Ustilaginomicetas e Himenomicetas, e definido várias linhagens e grupos filogenéticos dentro destas classes. O sistema de classificação de leveduras adoptado neste trabalho segue a terminologia proposta por estes autores. Na Tabela 3.2, adaptada de Sampaio e Fonseca (1995), estão resumidas algumas das características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que definem as classes e linhagens de leveduras basidiomicetas a seguir descritas. Para detalhes adicionais sobre classificação de leveduras basidiomicetas ver Boekhout *et al.* (1998) e Fell *et al.* (2001).

Urediniomicetas

A classe dos Urediniomicetas contém espécies de fungos em que as hifas, quando produzidas, são caracterizadas pela formação de septos com poros simples únicos. No entanto, existem algumas excepções, como por exemplo *Kriegeria eriophori* que apresenta

Tabela 3.2. Características discriminantes das leveduras basidiomicetas das classes Ustilaginomicetas, Urediniomicetas e Himenomicetas, e respectivos agrupamentos reconhecidos

Ustilaginomicetas		Urediniomicetas				Himenomicetas			
Característica	Microbotryum	Sporidiobolus	Erythrobasidium	Agaricostilbum	Cystoflobasidiales	Filobasidiales	Tremellales	Trichosporonales	
Basídio	Septos transversais ou não-septado	Septos transversais ou não-septado	Septos transversais	Septos transversais ou não-septado	Não-septado	Não-septado	Não-septado ou septos longitudinais ou transversais	?	
Teliósporos	+	+	+ / -	-	+ / -	-	-	-	
Balistoconóides	+ (um plano de simetria) / -	+ (um plano de simetria) / -	+ (um plano de simetria) / -	+ (um plano de simetria) / -	+ (um plano de simetria) / -	-	+ (um eixo de simetria) / -	-	
Tipo de poro	Poro simples, c/ espessamento junto à margem	Poro simples	Poro simples	Poro simples	Doliporo s/ parentessomas	Doliporo c/ ou s/ parentessomas	Doliporo c/ ou s/ parentessomas	Doliporo c/ ou s/ parentessomas	
Pigmento	Creme, amarelado, acastanhado	Creme	Rosa, vermelho	Creme, rosa acastanhado, laranja pálido	Creme, laranja, rosa, vermelho	Creme	Creme, laranja	Creme	
Ubiquinona predominante	10	10 (9)	9, 10, 10(H)	9 (10)	8, 9, 10	9, 10	9, 10	9, 10	
Componentes parede celular	Glucose, manose	Manose, glucose, fucose	Manose, glucose	Manose, glucose, fucose (+/-)	Glucose, manose, xilose	Glucose, manose, xilose	Glucose, manose, xilose	Glucose, manose, xilose	
%mol G + C	53 – 70%	44 – 66%	55 – 68%	45 – 57%	48 – 68%	50 – 60%	40 – 60%	55 – 63%	
Assimilação:									
Eritritol	+	-	-	+	- (+)	-	+	+	
Inositol	+	-	-	-	+	+	+	+	
Glucuronato	+	-	+	+	+	+	+	+	
Nitrato	+	+	+	-	+	+	-	-	
Compostos aromáticos	+	+	+	+	-	+	- (+)	+	
Produção compostos amiláceos	-	-	-	-	+	+	+	+	
Exemplos de gêneros	Malassezia Pseudozyma Rhodotorula Tilletiopsis	Bensingtonia Leucosporidium Rhodotorula Sporobolomyces	Rhodosporiidium Rhodotorula Sporidiobolus Sporobolomyces	Agaricostilbum Bensingtonia Kondoa Kurtzmanomyces	Cryptococcus Cystoflobasidium Mrakia Udeniomyces	Cryptococcus Filobasidium	Bullera Cryptococcus Fellomyces Filobasidiella	Apiotrichum Cryptococcus Trichosporan	

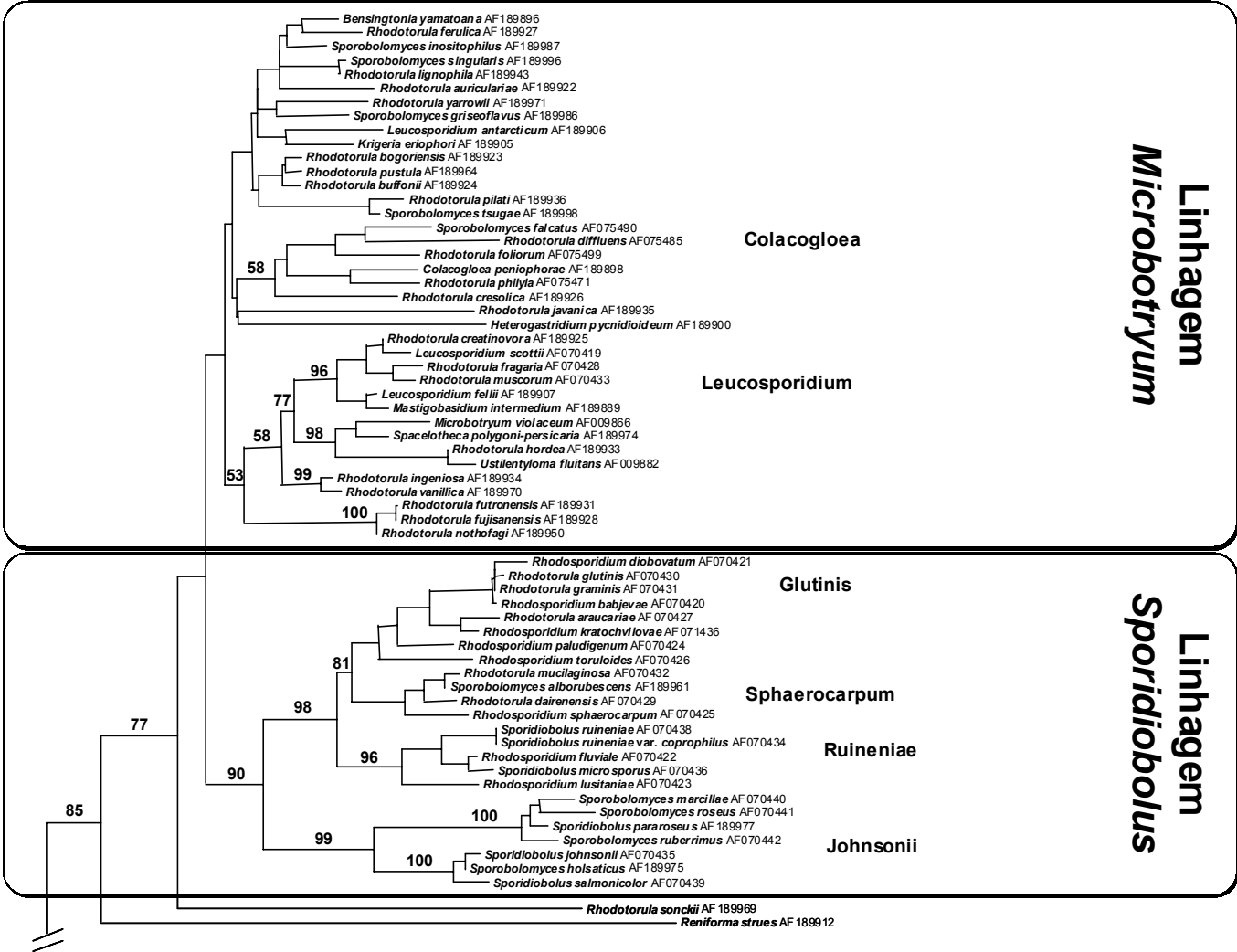
múltiplos poros do mesmo tipo. As espécies teleomórficas produzem basídios septados transversalmente ou não septados, e as paredes celulares têm como hidrato de carbono mais abundante a manose, com pequenas quantidades de glucose e, por vezes, fucose e ramnose. Os membros desta classe não assimilam, geralmente, inositol como fonte de carbono e energia, e não produzem compostos amiláceos extracelulares (p.e. Fell *et al.* 2001).

Muitos dos fungos micoparasitas membros desta classe caracterizam-se pela presença de colacossomas, organelos que foram primeiro descritos em *Colacogloea peniophora*, um parasita do fungo basidiomiceta *Peniophora* (Oberwinkler *et al.* 1990). Estas estruturas foram, mais tarde, encontradas em muitas outras espécies, incluindo leveduras como *Leucosporidium*, *Rhodospordium* e *Sporidiobolus* (Bauer *et al.* 1997), sugerindo um eventual micoparasitismo nestes géneros considerados, geralmente, como saprofíticos (Swann *et al.* 2001).

Esta classe dos Urediniomicetas compreende quatro linhagens principais em que se encontram espécies de leveduras: Agaricostilbum, Microbotryum, Sporidiobolus e Erythrobasidium (Figura 3.2). A distribuição das leveduras pelos diferentes grupos reflecte a natureza polifilética de muitos dos géneros reconhecidos, principalmente os anamórficos, cuja classificação foi baseada, essencialmente, em características morfológicas e noutras propriedades fenotípicas. Por exemplo, espécies pertencentes ao género *Bensingtonia* ocorrem nas linhagens Microbotryum e Agaricostilbum, *Rhodotorula* distribui-se, essencialmente, pelas linhagens Microbotryum, Sporidiobolus e Erythrobasidium, e *Sporobolomyces* pelas quatro linhagens.

A linhagem Microbotryum contém membros muito diversos, incluindo alguns fungos parasitas de plantas. Os géneros de leveduras aí incluídos são, entre outros, *Leucosporidium*, de que se conhece a fase sexuada, e os géneros anamórficos *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Bensingtonia*. A maioria das estirpes destas leveduras não são pigmentadas, sendo isoladas a partir de uma grande variedade de substratos, tais como a superfície de plantas, água e solo. Nesta linhagem parecem formar-se, com suporte estatístico, os agrupamentos denominados *Colacogloea* e *Leucosporidium* (Scorzetti *et al.* 2002).

Na linhagem Sporidiobolus incluem-se tanto as leveduras pigmentadas pertencentes aos géneros teleomórficos *Rhodospordium* e *Sporidiobolus* como os seus anamorfos *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*. Esta linhagem parece subdividir-se em quatro grupos principais: *Glutinis*, *Sphaerocarpum*, *Ruineniae* e *Johnsonii*.



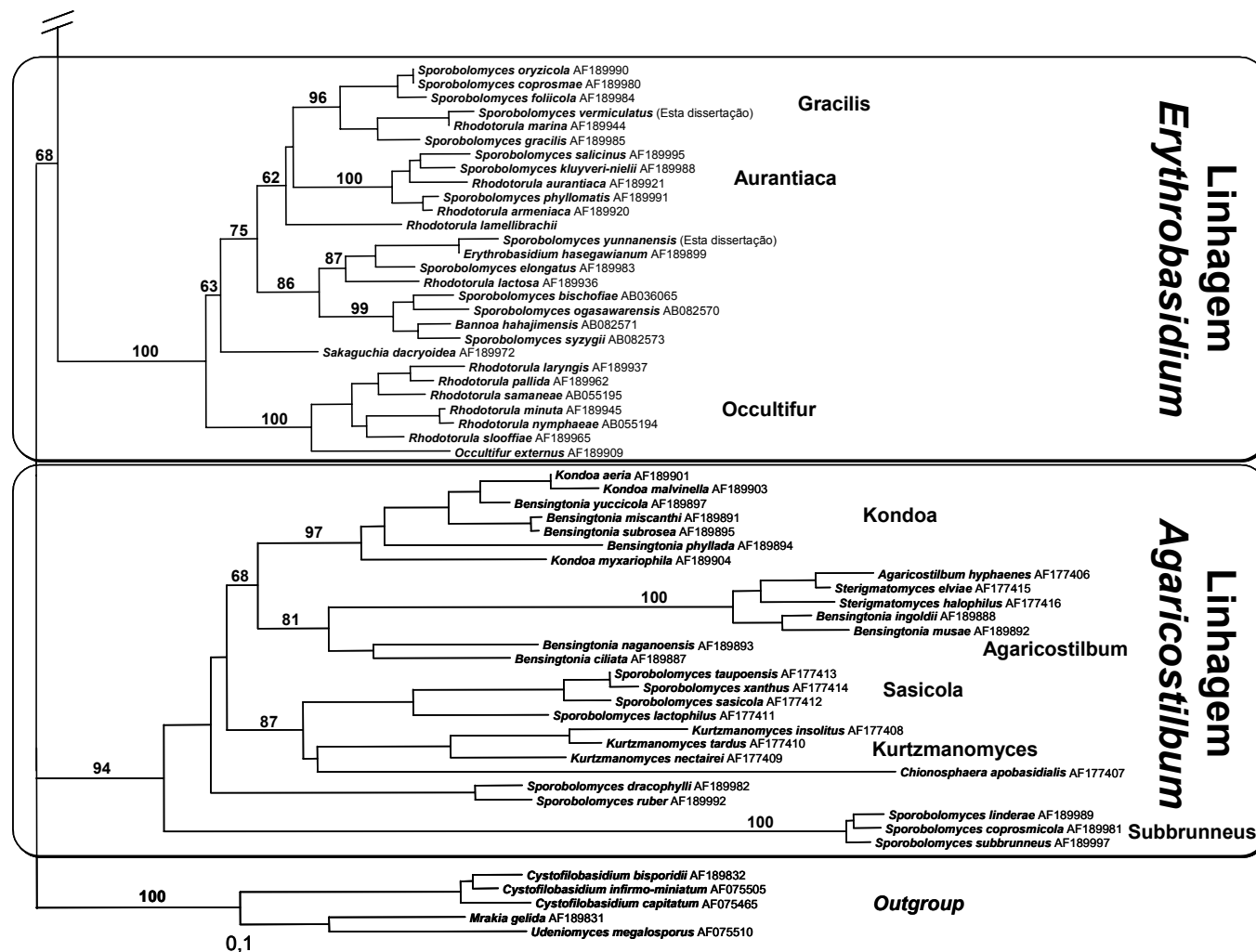


Figura 3.2. Árvore filogenética baseada na análise da sequência nucleotídica da região D1/D2, do gene do rRNA 26S, de membros dos Urediniomycetes, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições, estando apenas indicados os valores obtidos para a formação dos grandes grupos. A escala representa o número de substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente.

A linhagem *Erythrobasidium* contém os gêneros anamórficos *Sporobolomyces* e *Rhodotorula*, e os gêneros teleomórficos *Erythrobasidium*, *Sakaguchia* e *Occultifur*, cujas estirpes apresentam, geralmente, pigmentação rosa ou vermelha. Distinguem-se três grupos: *Occultifur*, *Aurantiaca* e *Gracilis*. Os ciclos de vida dos membros desta linhagem são relativamente heterogêneos. Por exemplo, *Sakaguchia dacryoidea* forma teliósporos que germinam e originam um metabasídio com 2-4 compartimentos, produzindo basidiósporos múltiplos por gemulação, e *Occultifur externus* não produz teliósporos, formando basídios auriculariídes com balistósporos (basidiósporos libertados por um processo de descarga idêntico ao dos balistoconídios).

A linhagem *Agaricostilbum* inclui os gêneros produtores de balistoconídios *Bensingtonia* e *Sporobolomyces*, gêneros anamórficos como *Sterigmatomyces* e *Kurtzmanomyces*, e o único gênero de leveduras deste grupo de que se conhece o ciclo de vida completo, *Kondoa*. Scorzetti *et al.* (2002) sugerem a existência de cinco sub-grupos nesta linhagem: *Kondoa*, *Agaricostilbum*, *Sasicola*, *Kurtzmanomyces* e *Subbrunneus*.

Himenomicetas

A classe dos Himenomicetas contém espécies cujas hifas têm septos complexos, com doliporos, muitas vezes com a presença de parentessomas. Os hidratos de carbono principais na parede celular são a glucose, manose e xilose, sendo a glucose o predominante. Os membros desta classe são, em geral, capazes de assimilar inositol e de produzir compostos amiláceos extracelulares (p.e. Fell *et al.* 2001).

Nesta classe são consideradas duas subclasses: “Hymenomycetidae” e “Tremellomycetidae”, correspondentes a duas linhagens diferentes (Swann e Taylor 1995). A sub-classe “Hymenomycetidae” não inclui leveduras, mas compreende todos os fungos Homobasidiomicetas (*Agaricales*, *Poliporales*, etc.) e membros de algumas ordens de Heterobasidiomicetas (*Dacrymycetales*, *Auriculariales*, etc.). A sub-classe “Tremellomycetidae” inclui quatro linhagens em que se encontram leveduras: *Filobasidiales*, *Tremellales*, *Cystofilobasidiales* e *Trichosporonales* (Figura 3.3). O gênero *Cryptococcus* é polifilético e ocorre em todas as linhagens. Muitos dos restantes gêneros estão delimitados nos seus grupos respectivos.

A linhagem Tremellales constitui um grupo heterogêneo (Fell *et al.* 2000, Scorzetti *et al.* 2002). Contém os gêneros de leveduras *Bullera*, *Bulleromyces*, *Fellomyces*, *Filobasidiella*, *Kockovaella* e *Tsuchiyaea*, além de espécies dimórficas dos gêneros *Tremella* e

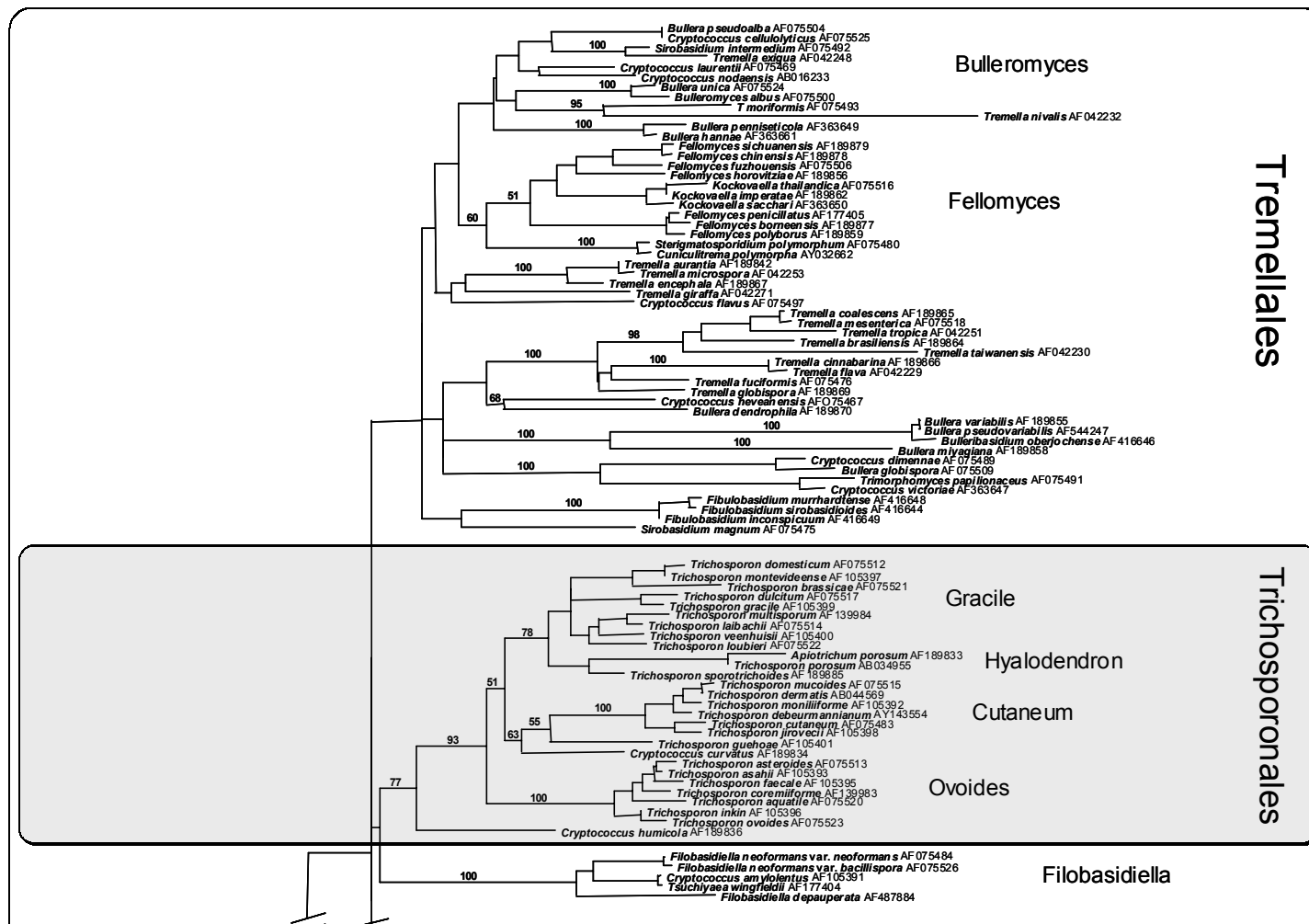
Sirobasidium. *Bulleromyces* e *Filobasidiella* são gêneros teleomórficos com estruturas sexuadas morfológicamente diferentes. *Bulleromyces* produz basídios com uma morfologia semelhante a muitos outros fungos deste grupo, enquanto que *Filobasidiella* apresenta um ciclo sexual distinto (Kwon-Chung 1998) que levou a que esta levedura fosse, durante muito tempo, classificada no grupo das Filobasidiales (Bandoni 1995, Boekhout *et al.* 1998). A inclusão, por Fell *et al.* (2000), de *Holtermannia corniformis* e espécies relacionadas no grupo das Tremellales foi confirmada pela análise de sequências da região ITS por Scorzetti *et al.* (2002).

Surtem quatro grupos de leveduras na linhagem das Tremellales, em resultado da comparação de sequências da região D1/D2 e ITS do rDNA: *Fellomyces*, *Bulleromyces*, *Luteolus* e *Filobasidiella*. Com a inclusão de sequências de novas espécies de leveduras, parecem estar a delinear-se mais dois grupos no interior desta linhagem, um que contém o género *Dioszegia* e um outro contendo as espécies *Cryptococcus nyarrowii*, *Cr. watticus* e *H. corniformis*.

A linhagem das Trichosporonales, que na árvore filogenética apresentada na Figura 3.3 aparece como um grupo interno das Tremellales, inclui todos os membros do género *Trichosporon*, com a excepção de *Trichosporon pullulans*. Este género é caracterizado pela formação de artroconídeos e inclui espécies importantes do ponto de vista clínico, tais como *Tr. asahii*, *Tr. cutaneum*, *Tr. inkin* e *Tr. mucoides*. Em outras espécies incluídas nesta linhagem, como *Apiotrichum porosum* e *Cr. curvatus*, não foi observada a produção de artroconídeos, apesar de haver produção de micélio e/ou pseudomicélio. Quatro grupos são reconhecidos nesta linhagem: *Gracile*, *Hyalodendron*, *Cutaneum* e *Ovoides*.

Além de espécies do género polifilético *Cryptococcus*, a linhagem Filobasidiales agrupa os membros do género teleomórfico *Filobasidium*. Parecem definir-se nesta linhagem quatro grupos: *Aerius*, *Floriforme*, *Albidus* e *Cylindricus*, este último contendo, até à data, apenas a espécie *Cr. cylindricus*.

A linhagem Cystofilobasidiales inclui a já referida espécie *Tr. pullulans* e outros géneros, cada um deles representando grupos distintos: *Cystofilobasidium*, *Mrakia*, *Udeniomyces* e *Xanthophyllomyces*. Alguns membros desta linhagem produzem teliósporos (*Cystofilobasidium* e *Mrakia*), uma característica que os distingue dos outros géneros teleomórficos Himenomicetas e que é, geralmente, encontrada entre os Urediniomicetas.



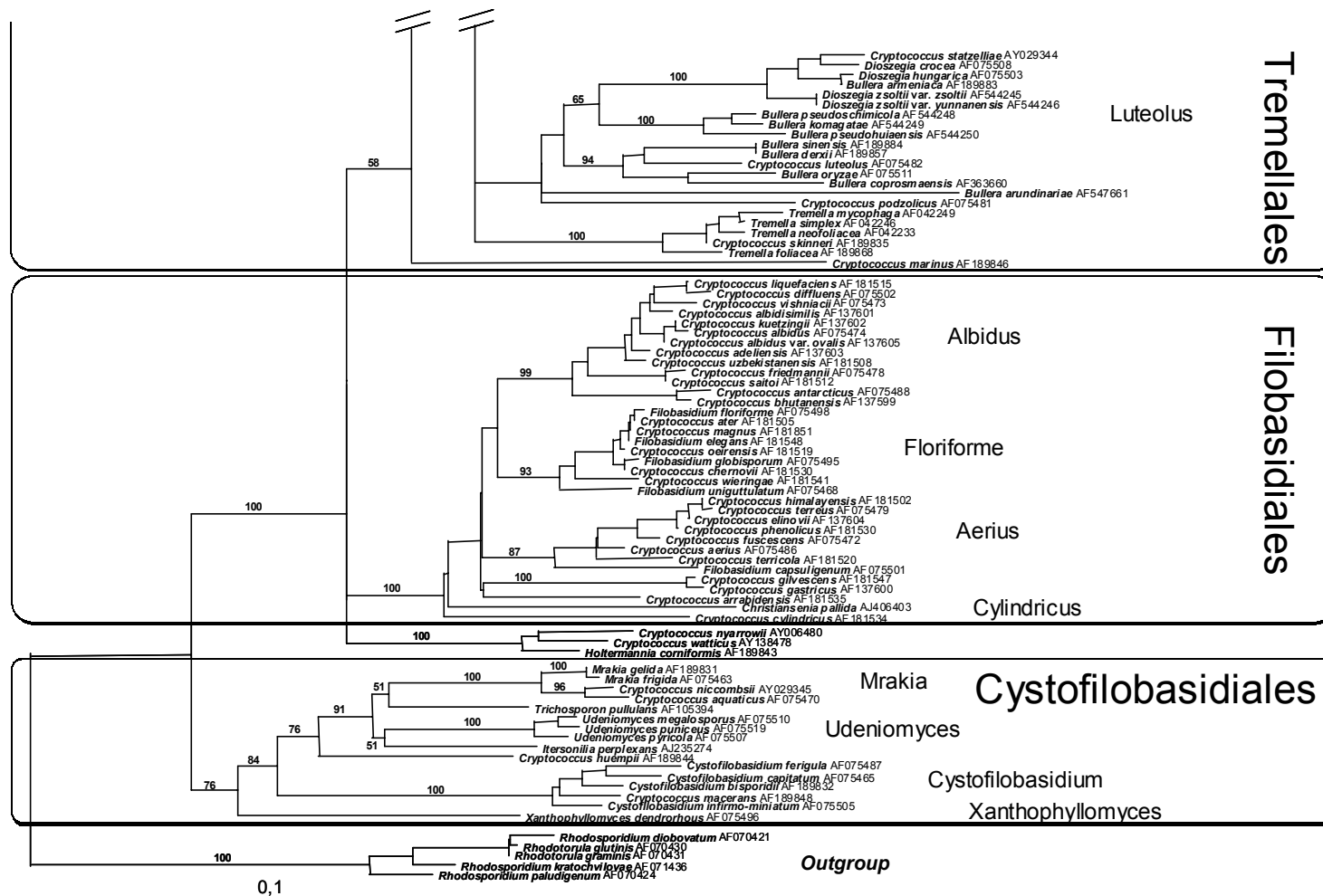


Figura 3.3. Árvore filogenética baseada na análise da sequência nucleotídica da região D1/D2, do gene do rRNA 26S, de membros dos Himenomicetas, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições, estando apenas indicados os valores obtidos para a formação de grandes grupos. A escala representa o número de substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente.

Ustilaginomicetas

Na classe dos Ustilaginomicetas é incluída a maioria dos Morrões (p.e. membros das ordens Ustilaginales e Tilletiales) e algumas leveduras, tais como *Pseudozyma fusiformata*, *Ps. tsukubaensis*, *Ps. antarctica*, *Sympodiomyces paphiopedili*, *Rhodotorula acheniorum*, *Rh. bacarum*, *Rh. hennulea*, *Rh. phylloplana* e espécies dos géneros *Tilletiopsis* e *Malassezia* (Figura 3.4). Todas estas leveduras parecem ocorrer em plantas, apesar de não existir qualquer informação sobre a possibilidade de serem simplesmente saprófitas ou estados leveduriformes de fungos dimórficos fitopatogénicos (Fell *et al.* 2001). O género *Malassezia*, cujas espécies se encontram normalmente associadas a humanos e animais, aparece num grupo separado dos restantes fungos ustilaginomicetas, tendo sido colocado na nova ordem Malasseziales por Begerow *et al.* (2000). Os fungos da classe dos Ustilaginomicetas contêm maioritariamente glucose na sua parede celular, com galactose e manose também presentes e xilose ausente (Fell *et al.* 2001), e produzem hifas com septos com microporos, diferentes dos poros simples porque, provavelmente, não existe um poro aberto verdadeiro.

III.1.2. Caracterização taxonómica de leveduras

Métodos convencionais

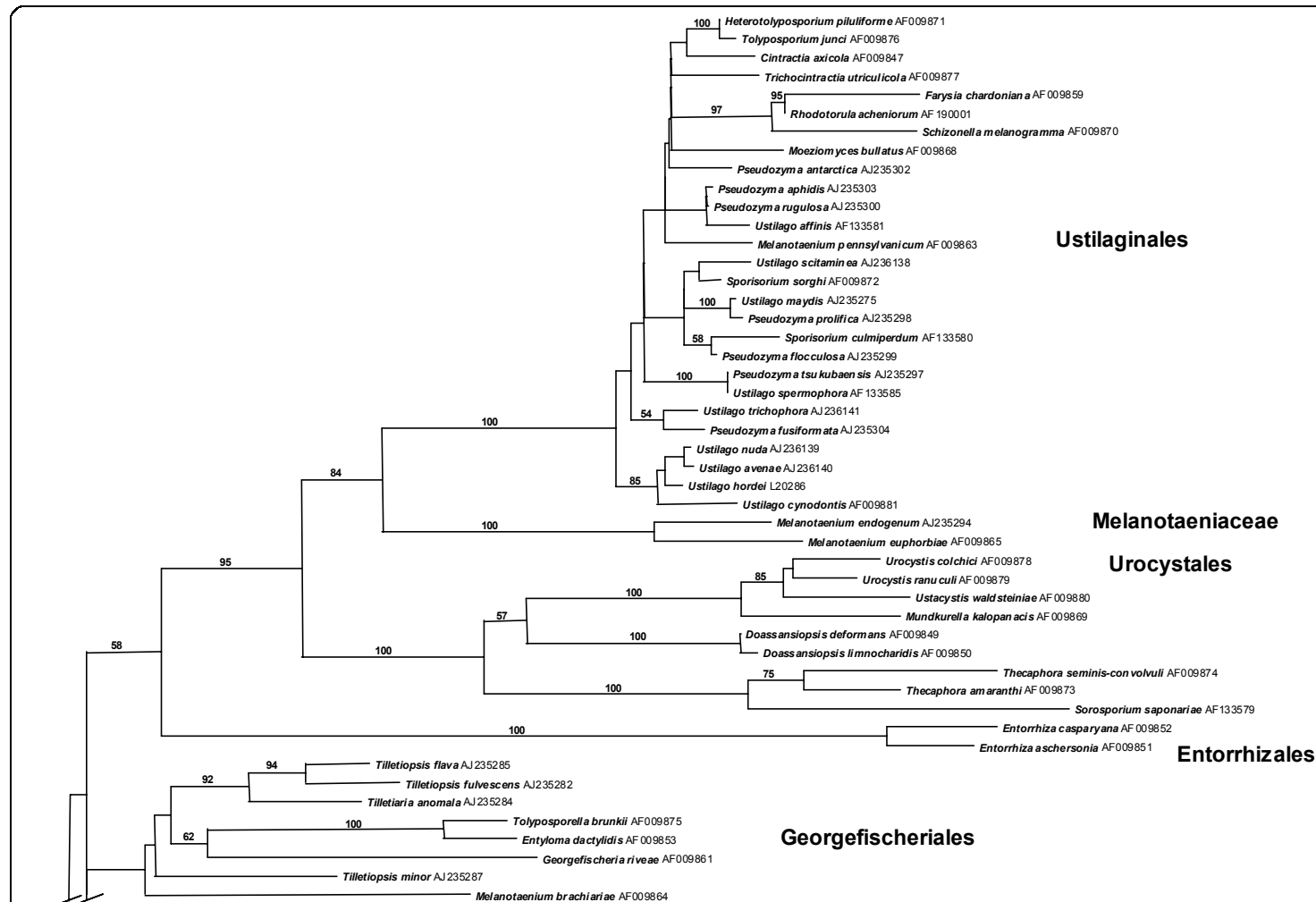
Os métodos convencionais de identificação e caracterização de leveduras, baseados em propriedades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, continuam a ser utilizados em rotina. Um dos primeiros passos para a caracterização de qualquer levedura é a observação das suas células ao microscópio, com apreciação da forma, tipo de reprodução assexuada (gemulação ou fissão) e sexuada (ascos, ascósporos, teliósporos, basídios, basidiósporos, etc.). O crescimento em meio sólido permite observar a cor das culturas, tipo de colónia (textura e margem), formação de pseudomicélio/micélio e eventual produção de balistoconídios. Antes de concluir sobre a inexistência de estruturas sexuadas em géneros anamórficos há que, por vezes, proceder a estudos de interfertilidade entre estirpes. Estes procedimentos são, no entanto, bastante laboriosos e muitas vezes falíveis, uma vez que o cruzamento de estirpes eventualmente compatíveis pode não resultar devido à inadequação dos meios de cultura utilizados. Todas estas características têm, no entanto, e principalmente na ausência de estruturas do ciclo de vida sexuada, um valor bastante limitado para a delimitação e definição das espécies de leveduras (Fell *et al.* 2001).

A caracterização fisiológica envolve a realização de testes de fermentação de vários açúcares (glucose, galactose, sacarose, maltose, lactose, rafinose, etc.) e de assimilação de diversos compostos como fontes de carbono e energia, ou como fontes de azoto (ver Tabela 2.1). A utilização intensiva destes testes terá levado à descrição de muitas espécies novas com base em apenas uma ou poucas diferenças nos padrões de assimilação (Phaff 1989), resultando em classificações muitas vezes ambíguas (Kurtzman e Sugiyama 2001) e a alterações frequentes de nomenclatura (Barnett *et al.* 2000, Kurtzman e Fell 1998). No entanto, as características fisiológicas contribuem para a caracterização global da levedura e algumas têm, certamente, valor taxonómico, nomeadamente a capacidade de fermentação e a assimilação de compostos que envolvam uma maior complexidade metabólica, como alguns compostos aromáticos de baixo peso molecular e ácidos aldáricos (Sampaio e Fonseca 1995).

Outro tipo de testes utilizados para a identificação de leveduras inclui a sensibilidade à cicloheximida, temperatura máxima de crescimento e osmotolerância. Alguns testes bioquímicos muito utilizados são a reacção das culturas com o corante azul de diazónio B (Teste do DBB) e a pesquisa da produção de urease, cujos resultados permitem diferenciar, na sua maioria, as leveduras basidiomicetas das ascomicetas (ver Tabela 3.1), e a produção de compostos amiláceos extracelulares. Salienta-se, ainda, a determinação do número de sub-unidades de isopreno da coenzima Q - CoQ (Sugiyama *et al.* 1985), constante em muitos géneros e/ou grupos de géneros, e a produção de toxinas *killer* (Golubev e Boekhout 1995).

Métodos moleculares

A aplicação de métodos de identificação moleculares, nomeadamente os baseados na comparação de ácidos nucleicos, tornou mais evidente as ambiguidades e inconsistências dos sistemas de classificação baseados essencialmente em critérios fenotípicos. Um dos primeiros métodos a ser utilizado para comparar espécies de leveduras foi a determinação do conteúdo molar em citosina e guanina (G + C) do DNA genómico. Duas leveduras não serão da mesma espécie se as diferenças entre os respectivos conteúdos em G + C for igual ou superior a 2%, mas os valores podem ser semelhantes sem haver conspecificidade. O primeiro método que, efectivamente, tentou reflectir distâncias genómicas entre espécies de leveduras foi o grau de homologia entre DNA's genómicos, que permitiu revelar relações teleomorfo - anamorfo (Boekhout 1991a), apreciar a possível conspecificidade de espécies fenotipicamente distintas (Boekhout 1991b) e detectar a correspondência de determinado padrão fenotípico a mais do que uma espécie (Guého *et al.* 1992). Esta metodologia é, no



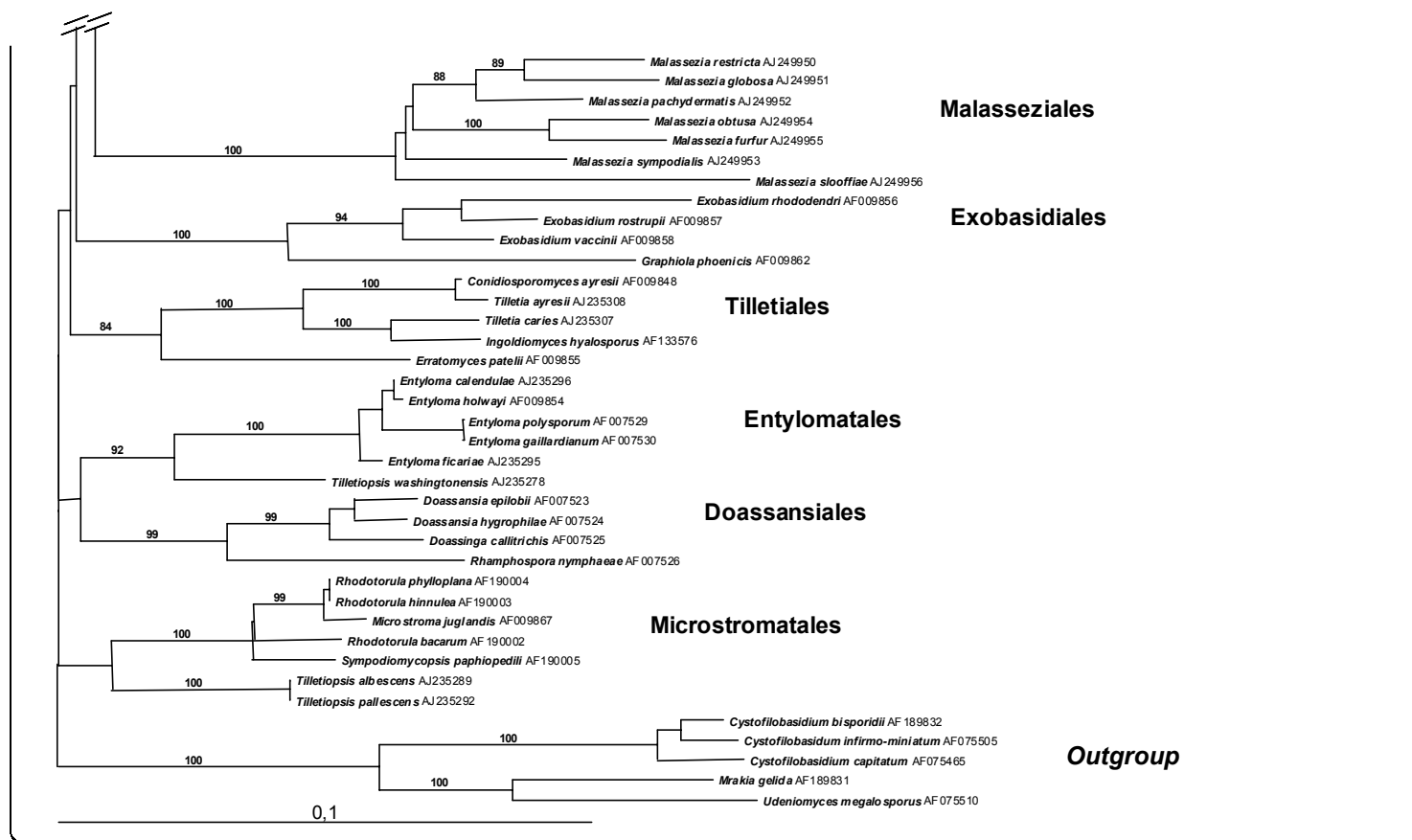


Figura 3.4. Árvore filogenética baseada na análise da sequência nucleotídica da região D1/D2, do gene do rRNA 26S, de membros dos Ustilaginomicetas, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições, estando apenas indicados os valores obtidos para a formação de grandes grupos. A escala representa o número de substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente.

entanto, experimentalmente laboriosa e não permite inferir sobre relações entre níveis taxonómicos hierarquicamente superiores ao de espécie.

O método molecular mais generalizado em estudos de taxonomia e para identificar leveduras baseia-se na comparação das sequências da região D1/D2 do gene do rRNA 26S e/ou do gene do rRNA 18S. Outras regiões da unidade de DNA ribossómico (ITS e IGS) e de genes específicos (p.e. β -tubulina e actina) têm sido também analisadas. Outros métodos moleculares utilizados para a identificação e/ou diferenciação de grupos de leveduras baseiam-se na reacção de PCR com *primers* específicos (Fell 1995, Mannarelli e Kurtzman 1998), análise de polimorfismos de restrição - RFLP (Magee *et al.* 1987) e de regiões mini- e micro-satélite – MSP-PCR (Gadanhó *et al.* 2001, Sampaio *et al.* 2001).

A comparação das sequências nucleotídicas de regiões do rDNA é, como referido, muito utilizada para a identificação e em estudos filogenéticos de leveduras. A análise de toda a informação genómica compilada por vários autores e existente em bases de dados públicas é hoje, também, um vasto campo de estudo que inclui o desenvolvimento de métodos de análise filogenética, o estudo da congruência entre os resultados obtidos a partir de diferentes métodos de construção das árvores filogenéticas, e a comparação de sequências nucleotídicas de diferentes *loci*. Qual o melhor método para a inferência de filogenias? Será que as sequências do rDNA são as mais indicadas para a realização deste tipo de estudos? Estas e outras questões são actualmente muito debatidas.

O cálculo de distâncias filogenéticas com base na análise comparativa de sequências de DNA pressupõe que as substituições nucleotídicas ocorram a uma velocidade previsível e, preferencialmente, constante. Alguns autores sugerem que a velocidade de substituição nucleotídica no rRNA 16-18S dos organismos procariontes e eucariontes é idêntica (Ochman e Wilson 1987). No entanto, outros evidenciam que estas velocidades podem diferir entre grupos filogenéticos e, possivelmente, entre espécies de um mesmo grupo (Britten 1986). Têm sido descritos vários métodos para o cálculo das distâncias filogenéticas com base na análise de sequências de macromoléculas (Felsenstein 1988, Saitou e Nei 1987), alguns dos quais desenhados para compensar as diferentes velocidades de substituição nucleotídica. Estes algoritmos têm sido implementados em programas informáticos para a inferência de filogenias (p.e. PHYLLIP, PAUP* e Mr. Bayes).

Begerow *et al.* (2000) demonstraram que as árvores filogenéticas obtidas a partir da análise de sequências da região D1/D2 do rDNA 26S de fungos ustilaginomicetas, utilizando o critério de parsimónia máxima ou o método *Neighbor-Joining* para a sua construção, apresentavam topologias idênticas, à parte alguns rearranjos no interior dos grandes grupos.

Kurtzman e Robnett (1998) compararam a consistência de árvores filogenéticas obtidas com base nas sequências da região D1/D2 do rDNA 26S com as baseadas no rDNA 18S. A análise das sequências da região D1/D2 permitiu uma maior resolução para certos grupos mas, com algumas exceções, as árvores obtidas eram semelhantes. A análise de sequências da proteína orotidina 5'-mono-fosfato-descarboxilase (Radford 1993) indicou que as leveduras gemulantes ascomicetas são um grupo irmão dos eusomicetas, resultado congruente com a análise das sequências do rDNA/rRNA. Tsai *et al.* (1994) demonstraram que as relações filogenéticas entre espécies de *Epichloë* eram as mesmas, quer se utilizasse sequências de rDNA ou do gene da β -tubulina. As relações filogenéticas entre os géneros *Dekkera* e *Brettanomyces* eram também idênticas quando obtidas a partir da análise de sequências de rDNA ou do gene da subunidade II da citocromo-oxidase mitocondrial (Boekhout *et al.* 1994). Daniel *et al.* (2001) utilizaram a sequência do gene da actina, com cerca de 980 bases, para estudarem as relações filogenéticas entre espécies de *Candida* e dos seus teleomorfos. Verificaram que, à parte alguns grupos contendo os géneros *Metschnikowia* e *Clavispora*, as árvores filogenéticas eram congruentes com as obtidas a partir da análise das sequências do rDNA.

Existem, no entanto, algumas incongruências nos resultados da análise de diferentes *loci*. Biswas *et al.* (2001) inferiram sobre a filogenia de espécies de *Rhodotorula*, e de espécies relacionadas, a partir da sequência do gene do citocromo *b* mitocondrial, com cerca de 400 bases. Comparando os resultados obtidos com os já conhecidos para os genes do rDNA, talvez o resultado mais surpreendente seja o de *Rh. bacarum* (classe dos fungos ustilaginomicetas) e *Rh. foliorum* (classe dos fungos urediniomicetas) terem as sequências do gene mitocondrial idênticas, o que suscita a questão sobre o valor deste *locus* para estudos filogenéticos (partindo do pressuposto que os autores validaram a identificação das estirpes).

Tendo em conta todas estas observações, deduz-se que se duas espécies são filogeneticamente próximas terão de aparecer em grupos relacionados, qualquer que seja o método de construção das árvores filogenéticas e independentemente do *locus* analisado (com especial importância para as sequências do rDNA). Já para as relações a um nível superior, entre géneros, famílias e/ou classes, há que procurar os métodos e *locus*, ou grupos de *loci*, mais adequados (Dalevi *et al.* 2001; Moncalvo *et al.* 2000a, b; Takahashi e Nei 2000).

Apesar da identificação de leveduras baseada apenas na morfologia e fisiologia dar, por vezes, resultados incorrectos ou ambíguos, a realização destes testes continua a ser muito importante numa era em que existe a tentação de considerar as técnicas moleculares,

nomeadamente a sequenciação de DNA, como capazes de proporcionar uma identificação correcta. O simples conhecimento de sequências de DNA não nos permite ainda saber se uma levedura apresenta morfologias variadas (p.e. pseudomicélio) ou consegue, por exemplo, assimilar um dado composto com eficiência ou produzir uma enzima em determinadas condições. As características bioquímicas, fisiológicas e morfológicas das leveduras poderão ser utilizadas para o diagnóstico e identificação de grupos específicos, para estudos ecológicos ou então, por exemplo, na pesquisa e selecção de leveduras potencialmente interessantes de um ponto de vista biotecnológico. Além disso, um conhecimento global das características biológicas das leveduras, integrando dados de ecologia, morfologia, fisiologia e moleculares, permite a obtenção de conclusões mais robustas sobre a sua classificação (Fell e Kurtzman 1998, Gadanho *et al.* 2001, Gadanho e Sampaio 2002, Sampaio *et al.* 2001).

O conceito de espécie em taxonomia de leveduras

Como já se referiu, a delimitação de uma grande parte das espécies de leveduras foi, durante décadas, realizada com base em critérios fenotípicos, como a morfologia dos ascósporos e basídios ou a capacidade de fermentar e assimilar diversos açúcares. Este tipo de classificação tem tendência a ser complementada, ou até substituída, pela utilização de critérios baseados na análise directa do genoma, com particular ênfase para a comparação de sequências de rDNA. Podemos, assim, considerar a morfo-espécie, resultante de uma delimitação baseada na descontinuidade das suas características fenotípicas, a espécie biológica, delimitada com base em critérios de interfertilidade, e a geno-espécie, cuja delimitação resulta da análise genética (van der Walt 1987).

É de sublinhar que a análise de sequências de rDNA é hoje um dos métodos mais poderosos para a identificação de leveduras. Os grupos pioneiros nesta área (Fell *et al.* 2000, Kurtzman e Robnett 1998) verificaram que a variação intraspecífica da região D1/D2 do rDNA 26S (ca. de 650 pb) de leveduras ascomicetas e basidiomicetas era, geralmente, de 0 a 2 nucleótidos, inferindo que estirpes com três ou mais bases de diferença nesta região representam, geralmente, espécies distintas. Kurtzman e Robnett (1998) verificaram que mais de três nucleótidos diferentes correspondiam a uma homologia entre DNAs genómicos inferior a 30%. São, no entanto, conhecidas algumas excepções. Por exemplo, estirpes sexualmente compatíveis da espécie ascomiceta *Metschnikowia agaves* apresentam cinco diferenças na região D1/D2, e estirpes da espécie basidiomiceta *Filobasidium capsuligenum* oito nucleótidos diferentes (Fell *et al.* 2000, Kurtzman e Robnett 1998). A viabilidade dos meiosporos formados não foi, no entanto, confirmada.

Outro tipo de exceção consiste em espécies de leveduras reconhecidamente distintas apresentarem sequências nucleotídicas iguais. Por exemplo, *Cr. ater*, *Cr. magnus*, *F. elegans* e *F. floriforme* (Filobasidiales) têm a sequência da região D1/D2 igual. Enquanto que *Cr. ater* e *Cr. magnus* poderiam constituir sinónimos, devido às suas semelhanças morfo-fisiológicas, o mesmo não se poderia dizer de *F. elegans* e *F. floriforme* que apresentam, entre outras características, estruturas sexuais morfologicamente diferentes. A sequenciação da região ITS (Fell *et al.* 2000) confirmou a conspecificidade das duas espécies de *Cryptococcus*, e a sua separação de *F. floriforme* e *F. elegans*, que constituem espécies distintas. Outros exemplos de espécies diferentes que apresentam sequências da região D1/D2 idênticas, e cuja resolução apenas foi obtida com a sequenciação de outros *loci*, foram apresentados por Fell e Blatt (1999), na separação entre *Xanthophyllomyces* e *Phaffia*, e por Díaz e Fell (2000), na separação entre espécies de *Mrakia*.

A região ITS é, geralmente, mais variável do que a região D1/D2, mas também ocorrem exceções (Scorzetti *et al.* 2002), como por exemplo as de *Tr. laibachii* e *Tr. multisporum*, que têm sequências da região ITS idênticas e sete diferenças na região D1/D2, e as do complexo em que se inclui *Sporidiobolus pararoseus* (Bai *et al.* 2002b).

De um ponto de vista prático, todas as características reunidas sobre uma determinada levedura, sejam elas fenotípicas, genotípicas ou resultantes do estudo da ecologia das próprias populações, podem e devem ser tidas em conta na definição de novas espécies. Geralmente, dá-se um maior peso à definição biológica de espécie, quando se conhecem estirpes compatíveis heterotáticas, ou homotáticas, que originam o ciclo de vida completo e quando a progenia resultante do cruzamento de estirpes compatíveis é fértil. Quando estamos em presença de leveduras para as quais não se conhece a fase sexuada do seu ciclo de vida, a definição baseada na análise genética e genómica prevalece. Os critérios seguidos neste trabalho para a identificação das leveduras estudadas seguiram estes princípios, tendo sido definidas espécies contendo estirpes compatíveis, que produziam o ciclo de vida completo, e também geno-espécies, baseadas em diferenças nas sequências nucleotídicas do rDNA. Evitou-se, no entanto, definir espécies baseadas apenas na análise das sequências nucleotídicas, tendo em conta as exceções atrás referidas.

III.2. Material e Métodos

Os métodos utilizados na caracterização fenotípica dos isolados estão descritos na secção “Material e Métodos” do Capítulo II, assim como o procedimento utilizado para a extracção de DNA genómico das leveduras e sequenciação das regiões D1/D2 do rDNA 26S e ITS.

Determinação de polimorfismos de regiões mini- e micro-satélite (MSP-PCR)

As células dos organismos eucariontes apresentam, espalhadas ao longo do seu genoma, sequências repetidas adjacentes em regiões não codificantes (*SSRs* - *Simple Sequence Repeats*), denominadas de regiões micro- (repetições de 2 – 10 nucleóticos: p.e. GAC e GTG) ou mini-satélite (15 – 30 nucleóticos). Quando são usados *primers* complementares a estas regiões numa reacção de PCR é obtido, após electroforese em gel de agarose, um perfil de bandas denotando diversos polimorfismos entre os genomas de diferentes estirpes/espécies (p.e. distância entre essas regiões no genoma).

Os *primers* utilizados foram: M13 (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3'), (GTG)₅ (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3') e (GAC)₅ (5'-GAC GAC GAC GAC GAC-3'). O volume final da mistura reaccional foi de cerca de 25 µl, que continha: 6 µl de água bidestilada; 2,5 µl de Tampão da *Taq* polimerase 10× (Amersham Biosciences); 2 µl de cloreto de magnésio 25 mM; 5 µl de solução de dNTPs (1,25 mM cada); 4 µl do *primer* (5 µM); 0,2 µl de *Taq* polimerase (Amersham Biosciences); e 5 µl da diluição de DNA obtida após a extracção (ver Cap. II). A amplificação de DNA foi realizada num termociclador Uno II (Biometra). Condições de amplificação: 1. desnaturação a 95 °C, durante 5 min; 2. 40 ciclos de amplificação (45 s a 93 °C, 60 s a 55 °C e 60 s a 72 °C); 3. extensão final durante 6 min a 72 °C.

Para a detecção dos produtos de amplificação foi realizada uma electroforese em gel de agarose (Gibco, BRL) 1,4% p/v em tampão 0,5× TBE (Tris-Borato-EDTA – Ver Apêndice I), durante 3,5 h a 90 V. Em cada gel foi incluído um marcador de pesos moleculares (p.e. DNA do fago λ cortado com *Hind*III e DNA de φx174 cortado com *Hae*III - Amersham Biosciences). O gel foi depois corado num banho com uma solução de brometo de etídio (2 mg/ml) e as bandas visualizadas sobre um transiluminador UV. As imagens obtidas foram registadas com o sistema Kodak Digital Science EDA 120, com o auxílio do programa informático Kodak Digital Science 1D Image Analysis. Os padrões de bandas de DNA foram analisados com o programa informático GelCompar V. 4.1 (Applied Maths 1998). As

semelhanças entre os vários perfis foram estimadas com o coeficiente de Pearson, e os agrupamentos formados utilizando o método UPGMA.

Existe uma certa subjectividade na análise dos padrões de bandas de DNA resultantes. Por vezes, o resultado obtido utilizando os programas informáticos não corresponde à inspecção visual dos perfis, devido às diferentes intensidades apresentadas pelas bandas de DNA. Houve o cuidado de combinar a análise numérica, utilizando programas informáticos adequados, com uma inspecção visual dos mesmos perfis, à semelhança de outros autores (Gadanh e Sampaio 2002).

Alinhamento de sequências de DNA e construção de árvores filogenéticas

Os alinhamentos das sequências de DNA foram realizados com o programa informático MegAlign (DNASStar), e visualmente inspeccionados. Foram obtidas árvores filogenéticas com o programa informático PAUP*, versão 4.0, usando o método *Neighbor-Joining*. As distâncias entre as sequências foram determinadas usando o modelo *Kimura's two-parameter*. Foi testado o suporte estatístico das árvores filogenéticas obtidas com uma análise de *bootstrap*, utilizando 1000 réplicas.

Análise comparativa do DNA nuclear

Para determinar o grau de homologia entre o DNA nuclear de pares de estirpes de leveduras foi utilizado o método espectrofotométrico (Seidler e Mandel 1971).

Extracção de DNA genómico

A levedura foi cultivada num litro de meio YM, a pH 6, em balão Erlenmeyer (2 L) incubado durante 5 a 7 dias à temperatura ambiente, com agitação orbital (180 rpm). As células foram recolhidas por centrifugação (10 000 g, 4 °C, 5 min) e lavadas duas vezes com água bidestilada, e uma vez com EDTA salino (NaCl 0,15 M; EDTA 0,1 M; pH 8,0). Por cada 6 g de peso húmido de células foram adicionados 9 ml de Tampão de Lise (Ver Apêndice I) e a suspensão foi congelada a – 70 °C durante pelo menos 12 h, em êmbolos de aço. A suspensão congelada foi prensada através de um orifício estreito (com o auxílio de uma prensa hidráulica - Tipo Eaton), rebentando as células, e recolhida directamente para tubos de centrífuga. Após centrifugação (16 000 g, 0 °C, 30 min), o sobrenadante foi recuperado e mantido em gelo até ao passo seguinte.

Purificação do DNA

O DNA foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de hidróxi-apatite (BioRad HTP). Uma coluna de vidro (2,5 cm × 20 cm) com 3 g de hidróxi-apatite, previamente lavada duas vezes com 20 ml de Tampão de Lavagem (Ver Apêndice I), foi ligada a uma bomba peristáltica. Após retirar o excesso de tampão de lavagem, o sobrenadante obtido anteriormente foi aplicado à superfície da coluna. A resina foi depois lavada com Tampão de Lavagem até que a absorvência a 260 nm do tampão eluído fosse inferior a 0,05. Aplicou-se, então, 30 ml de Tampão Fosfato diluído, para remoção da ureia, eluindo-se de seguida o DNA com Tampão de Eluição (Ver Apêndice I). O eluído com uma absorvência a 260 nm superior a 0,5 foi recolhido, e dialisado em SSC 0,1 M, a 4 °C, durante 48 h, sob agitação suave, com substituição do tampão ao fim de 24 h. Após diálise, procedeu-se à adição de 2 volumes de etanol absoluto arrefecido (- 20 °C) e 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M. O DNA foi precipitado a -70 °C durante 30 min, até se formar uma suspensão viscosa. Esta suspensão foi centrifugada (16 000 g, 0 °C, 30 min), o sobrenadante descartado, e o DNA precipitado foi lavado com etanol a 70% v/v. Após a secagem sob vácuo, preparou-se a solução de DNA em tampão SSC 0,1 M, mantida depois a -20 °C.

Determinação da pureza da solução de DNA

A pureza da solução de DNA foi avaliada espectrofotometricamente através das razões entre as absorvências a 230, 260 e 280 nm. Estas razões devem estar compreendidas nos seguintes intervalos: $1,65 \leq DO_{260 \text{ nm}} / DO_{280 \text{ nm}} \leq 1,85$ e $0,45 \leq DO_{230 \text{ nm}} / DO_{260 \text{ nm}} \leq 0,55$ (Sambrook e Maniatis 1989).

Reassociação DNA/DNA

Para a determinação dos valores de homologia entre o DNA nuclear das duas estirpes a comparar foi utilizado um espectrofotómetro Gilford Response IV-VIS (U.S.A.). Cada *micro-cuvette*, contendo 280 µl da solução de DNA (de uma estirpe, ou da mistura em partes iguais de duas estirpes) em Tampão de Reassociação (ver Apêndice I), com uma absorvência de $1,50 \pm 0,02$, foi hermeticamente fechada e colocada na câmara termostatzada do espectrofotómetro. Foram registados os valores de absorvência à temperatura óptima de renaturação ($T_m - 25$ °C) previamente determinada, em que T_m corresponde à temperatura de 50% de desnaturação do DNA nas condições usadas, e após subida de temperatura até 95 °C (DNA desnaturado). Depois de uma desnaturação completa do DNA a 95 °C durante 10 min, e descida rápida da temperatura para a temperatura óptima de renaturação, foi registada a cinética de renaturação do DNA através dos valores de absorvência a 260 nm ao longo do tempo. O grau de homologia DNA/DNA foi determinado segundo Seidler e Mandel (1971), com base nas curvas de C_0t (C_0 indica a concentração do DNA e 't' o tempo de incubação), nomeadamente no valor médio da

renaturação, $C_0t^{1/2}$ (tempo ao fim do qual 50% do DNA se encontra reassociado). Estes autores verificaram que quando o $C_0t^{1/2}$ da mistura ($C_0t^{1/2}_{mix}$) era semelhante à média dos $C_0t^{1/2}$ dos DNAs separados ($C_0t^{1/2}_{100}$) havia um elevado grau de homologia. Quando não existia nenhuma semelhança entre os dois DNAs, pertencentes a organismos diferentes, o valor de $C_0t^{1/2}$ da mistura era igual à soma dos valores de $C_0t^{1/2}$ individuais ($C_0t^{1/2}_0$). Valores de $C_0t^{1/2}$ da mistura intermédios corresponderiam a semelhanças intermédias entre os dois DNAs reassociados. A relação quantitativa entre os valores de $C_0t^{1/2}$ obtidos com a mistura de DNA e a percentagem de homologia entre os mesmos é obtida pela equação:

$$\%homologia = \{1 - [(C_0t^{1/2}_{mix} + (C_0t^{1/2}_{100} - C_0t^{1/2}_0)) / C_0t^{1/2}_{100}]\} \times 100 \quad (3.1)$$

III.3. Resultados e Discussão

A caracterização preliminar dos isolados permitiu uma primeira diferenciação das várias estirpes de levedura e a formação de grupos mais ou menos abrangentes (ver Tabela 3.2 e Apêndice II). Algumas das estirpes foram, então, seleccionadas para uma caracterização taxonómica mais aprofundada. Esta segunda caracterização incluiu: (i) a realização dos testes fisiológicos convencionais de identificação de leveduras, cujos resultados se encontram listados no Apêndice III; (ii) a comparação de perfis de fragmentos de DNA obtidos por MSP-PCR de estirpes morfo- e fisiologicamente semelhantes (previamente agrupadas de acordo com as respostas aos testes preliminares); e (iii) a obtenção das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do rDNA 26S e da região ITS. Foi ainda determinado o grau de homologia do DNA nuclear de alguns pares de estirpes. A análise taxonómica dos isolados integrou todos os dados recolhidos e disponíveis na altura da preparação desta dissertação.

Apesar de se ter detectado alguma variação nos perfis de fragmentos de DNA obtidos com a técnica de MSP-PCR, para uma mesma estirpe, relacionada com a utilização de diferentes lotes de *primers*, esta metodologia serviu para uma caracterização e diferenciação preliminar dos isolados. Sempre que possível, todos os estudos sobre um determinado grupo de leveduras foram realizados na mesma altura, com os mesmos reagentes e condições. A utilização de estirpes de referência pode também conduzir à identificação directa de algumas leveduras utilizando apenas MSP-PCR, no caso dos isolados apresentarem perfis idênticos aos das estirpes de referência, o que corresponderá a uma presumível conspecificidade.

Foi também desenvolvida uma aplicação informática, *YEAST 3000 – FISIO COMPARE* (Apêndice IV), que permitiu comparar os resultados obtidos com as várias estirpes identificadas pelos métodos convencionais, entre elas e com estirpes de referência cujos resultados estão descritos (Barnett *et al.* 2000, Kurtzman e Fell 1998).

III.3.1. Taxonomia de isolados da classe Himenomicetas

Linhagem Tremellales - leveduras produtoras de pigmento laranja

Foram isoladas do filoplano das plantas estudadas 43 estirpes de levedura caracterizadas pela produção de colónias de cor laranja e capacidade de produção de compostos amiláceos extracelulares. Estas leveduras foram incluídas na linhagem Tremellales da

classe Himenomicetas, usando uma combinação de resultados fenotípicos e moleculares, nomeadamente a sequenciação de regiões do rDNA. Nesta linhagem, os géneros de leveduras anamórficas mais frequentes são *Cryptococcus* e *Bullera*, que apresentam muitas características macromorfológicas e fisiológicas comuns, mas que diferem na produção de balistoconídios com um eixo de simetria por parte dos representantes do género *Bullera*. Recentemente, Takashima *et al.* (2001) redefiniram nesta linhagem o género *Dioszegia*, cujos membros produzem colónias de cor laranja (uma característica pouco frequente entre as Tremellales) e podem, ou não, ser produtores daquele tipo de balistoconídios. Estes autores consideraram, por exemplo, que *Cr. hungaricus* e *Bullera armeniaca* são sinónimos, tendo reunido as estirpes de ambas na espécie *Dioszegia hungarica*. Posteriormente, Bai *et al.* (2002a) descreveram duas variedades de uma nova espécie *D. zsoldii*.

Na Tabela 3.3 apresenta-se a listagem das estirpes de levedura estudadas, incluindo estirpes de referência, com a sua origem e designação final proposta. Na Figura 3.5 apresenta-se um dendrograma obtido a partir da análise dos perfis de bandas de DNA por MSP-PCR com o *primer* M13 para as estirpes listadas na Tabela 3.3, com a excepção de JCM 11291^T e de JCM 11296^T cujas estirpes não estavam disponíveis na altura da realização destes ensaios, tendo os seus perfis sido obtidos mais tarde.

Da análise deste dendrograma ressalta a formação de dois grupos de perfis relativamente homogéneos e com bastantes elementos. Um destes grupos apresenta perfis de MSP-PCR similares aos apresentados pela estirpe tipo de *D. hungarica* (PYCC 3954^T), levando a supor a conspecificidade das estirpes estudadas com esta espécie. O outro grupo de perfis corresponde a uma série de estirpes que representam uma espécie de levedura não reconhecida, designada por *Cryptococcus* sp. nov. 1 (Figura 3.5). Observam-se ainda outros grupos de perfis, com menos estirpes, aparentemente correspondendo também a espécies não reconhecidas. É o caso de um grupo denominado *Dioszegia* sp. nov. 1, com perfis de bandas relativamente homogéneos, e um outro grupo com três estirpes, correspondentes a uma espécie denominada *Dioszegia* sp. nov. 2. Ainda um outro grupo de três estirpes poderá corresponder a uma espécie de levedura recentemente descrita, *D. zsoldii* (Bai *et al.* 2002a). Para algumas das leveduras pertencentes aos grupos formados a partir da análise dos perfis de MSP-PCR, e para todas aquelas que apresentavam perfis únicos, foi obtida a sequência nucleotídica da região D1/D2 do rDNA 26S, e construída uma árvore filogenética, utilizando também as sequências de estirpes de referência pertencentes à linhagem Tremellales da classe Himenomicetas (Figura 3.6).

Tabela 3.3. Leveduras caracterizadas produtoras de pigmento laranja pertencentes à linhagem Tremellales, classe Himenomicetas, e respectiva origem

Espécie	Estirpe	Origem
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 1	1CSF5	Folha de <i>Cistus albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	2CSF7	<i>Idem</i>
	2CSFm1	<i>Idem</i>
	2CSFm8	<i>Idem</i>
	2CVFm15	<i>Idem</i>
	3CSF1	<i>Idem</i>
	5CSF3	<i>Idem</i>
	5CSFe14	<i>Idem</i>
	5CSFe16	<i>Idem</i>
	5CSFe17	<i>Idem</i>
	5CSFe4	<i>Idem</i>
	5CVFe1	<i>Idem</i>
	5CVFe2	<i>Idem</i>
	5CVFe3	<i>Idem</i>
	A2CSV7	<i>Idem</i>
	A2CVV5	<i>Idem</i>
	A3CSV13b	<i>Idem</i>
	PYCC 4561	Flor (Portugal)
	PYCC 4702	Água estagnada (Sintra, Portugal)
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 2	3CVF16	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 3	6PSF1	Folha de <i>Pistacia lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Dioszegia</i> sp. nov. 1	2AVF10	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	5AVFs3	<i>Idem</i>
	5CSFe15	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	5CVFe14	<i>Idem</i>
	6PVF13	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)
	A2AVS8	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Dioszegia</i> sp. nov. 2	A2AVV2	<i>Idem</i>
	A2AVV3	<i>Idem</i>
	A2QSS2	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	A2QSS4	<i>Idem</i>
	4AVF6	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Dioszegia</i> sp. nov. 3	PYCC 5433 ^T (1)	Fruto de <i>Fragaria abanassa</i> (Reino Unido)
<i>D. crocea</i>	2AVF11	Folha de <i>Acer monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
<i>D. hungarica</i>	2AVF18	<i>Idem</i>
	5QSF24	Folha de <i>Quercus faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	6CVFmeio9	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	A1CSV2	<i>Idem</i>
	A1PSV1	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)
	A2AVS7	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	A2AVV1	<i>Idem</i>
	A2QVS1	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	A2QVV1	<i>Idem</i>
	PYCC 3954 ^T (2)	Solo (Külsó-tó, Hungria)
	PYCC 5432 (3)	<i>Brassica oleacea</i> var. <i>capitata</i> (Reino Unido)
<i>D. zsoitii</i> var. <i>zsoitii</i>	JCM 11291 ^T	Folha de <i>Nerium indicum</i> (Yunnan, China)
<i>D. zsoitii</i> var. <i>yunnanensis</i>	JCM 11296 ^T	Folha de <i>Parthenocissus</i> sp. (Yunnan, China)
<i>D. cf. zsoitii</i>	2PSF1	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)
	A2CSV3	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	5CSFe13	<i>Idem</i>

(1) Tipo de *B. crocea*; (2) Tipo de *Cr. hungaricus*; (3) Tipo de *B. armeniaca*.

A análise destes resultados permitiu inferir sobre a classificação de algumas das estirpes estudadas. Talvez um dos factos mais salientes, e interessantes, tenha sido a separação das estirpes designadas por *Cryptococcus* sp. nov. 1 em relação às outras leveduras produtoras de pigmento laranja, agrupando-se com alguns membros do género teleomórfico *Tremella* (Figura 3.6). As culturas da nova espécie apresentam, como referido, uma cor laranja vivo e uma textura cremosa a tender para mucosa. As estirpes PYCC 4702, isolada a partir de água estagnada, e PYCC 4561, de uma flor, existentes na Colecção Portuguesa de Culturas de Leveduras, deverão também pertencer a esta espécie. Não foi

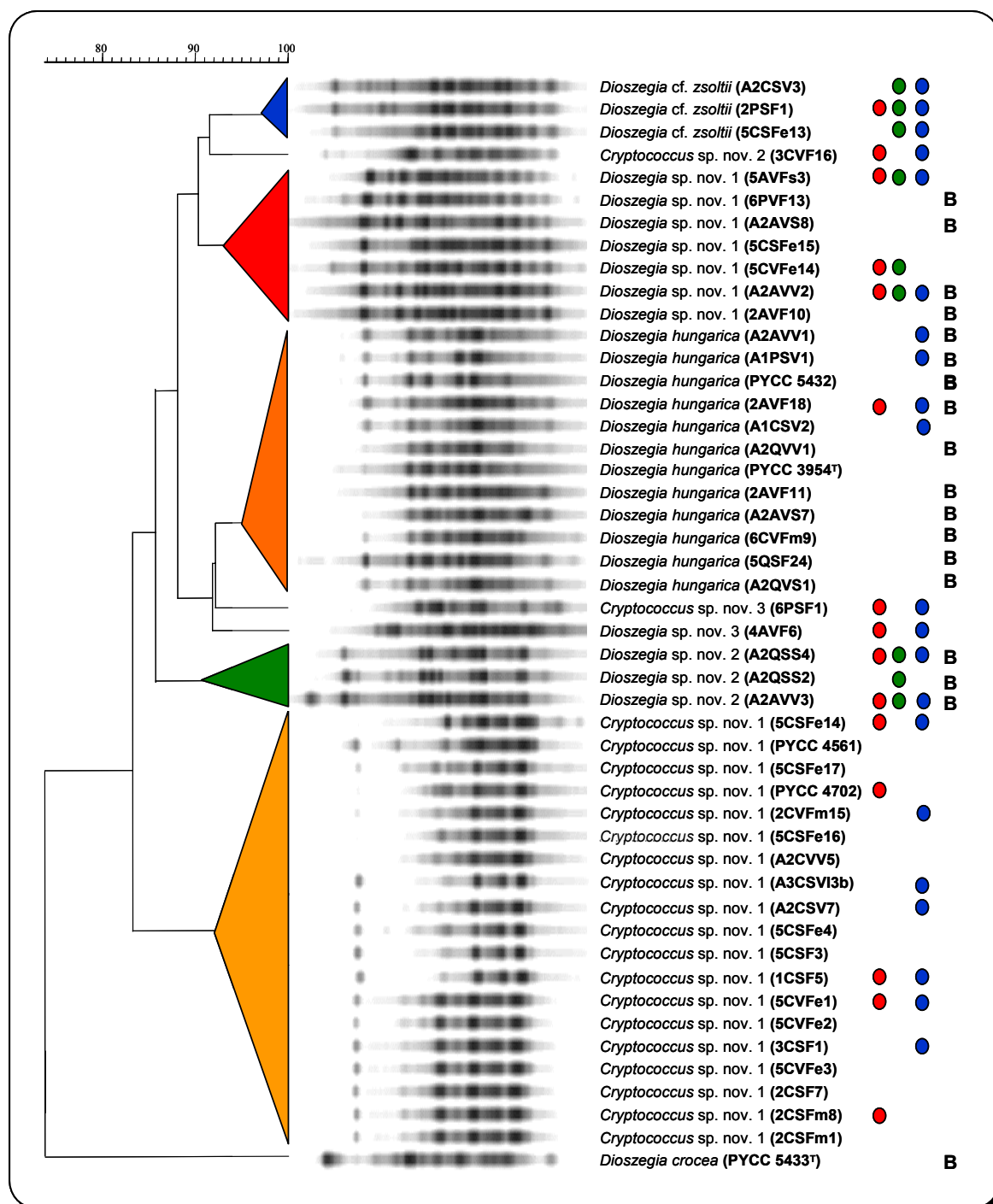


Figura 3.5. Dendrograma de isolados de leveduras da classe Himenomicetas, linhagem Tremellales, produtoras de colónias de cor laranja, construído com base na comparação de perfis de bandas de DNA obtidos por MSP-PCR com o *primer* M13 (Coeficiente de Pearson; programa informático GelCompar). T – Estirpe Tipo; ● – Estirpe seleccionada para sequenciação da região D1/D2; ● – Estirpe seleccionada para sequenciação da região ITS; ● – Estirpe para a qual foi realizada a identificação fenotípica completa; B – Produção de balistoconídios.

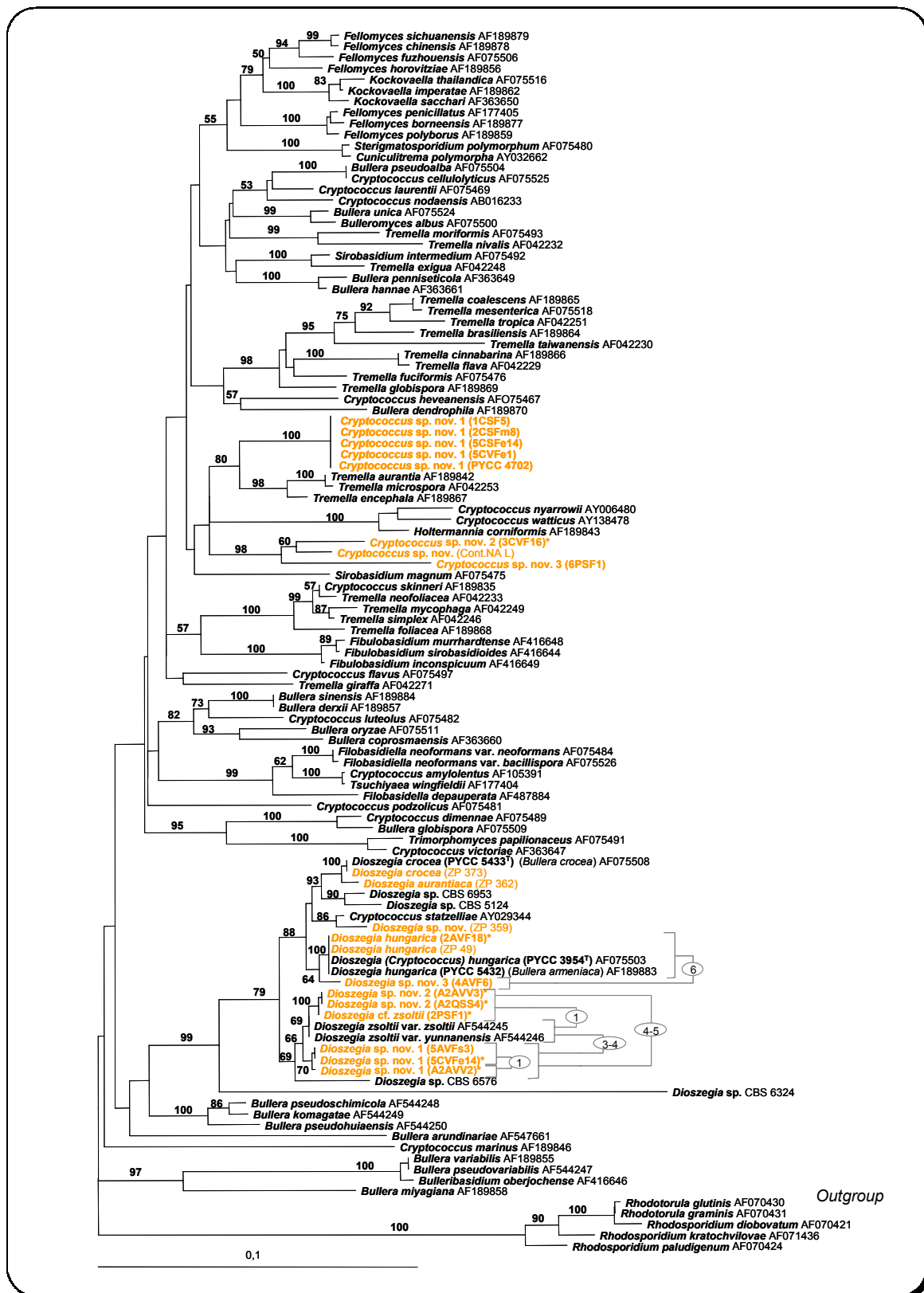


Figura 3.6. Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de leveduras produtoras de colônias de cor laranja, e outras espécies da linhagem Tremellales, obtida pelo método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente. As sequências determinadas neste estudo estão realçadas a laranja. Nalguns casos é indicado o número de bases diferentes entre as sequências de algumas estirpes. *Sequências determinadas por L. Portugal.

detectada nas culturas de *Cryptococcus* sp. nov. 1 a produção de balistoconídios, e os diversos cruzamentos entre estas estirpes em diversos meios de cultura revelaram-se infrutíferos. Estas leveduras diferenciam-se fisiologicamente das outras caracterizadas deste grupo pela assimilação de *meso*-eritritol por parte da maioria das estirpes (Tabela 3.4 e Apêndice III).

Tabela 3.4. Testes fisiológicos discriminantes entre as espécies de leveduras caracterizadas produtoras de pigmento laranja e pertencentes à linhagem Tremellales

	L-Sorbose	L-Arabinose	D-Arabinose	Melibiose	Lactose	Amido	Glicerol	meso-Eritritol	myo-Inositol	Nitrito	Cresc. s/ vitaminas	Cicloheximida 100 ppm
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 1	-	+	+	+	+	-	D (-)	+	+	-	-	-
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 2	-	+	+	+	+	+	D	-	+	+	-	D
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 3	-	-	+	D	+	+	-	-	D	-	-	-
<i>Dioszegia</i> sp. nov. 1	-	+/D	+/-	+/-	w/-	-	-	-	D/-	+/-	-	+/-
<i>Dioszegia</i> sp. nov. 2	D/w	+	-/D	+	+/D	-	-	-	D	+	-	D/-
<i>Dioszegia</i> sp. nov. 3	D	+	-	-	-	-	D	-	-	-	+	-
<i>D. hungarica</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	D	+	-	D
<i>D. cf. zsoldii</i>	D (-)	+	V	+	+	-	-	-	D/w	+	-	D/+

D – Crescimento lento; w – Crescimento fraco; V – resultado variável.

A sequenciação da região D1/D2 permitiu ainda concluir que as estirpes 3CVF16 (*Cryptococcus* sp. nov. 2) e 6PSF1 (*Cryptococcus* sp. nov. 3), produtoras de culturas de cor laranja bastante mucosas, com perfis de MSP-PCR únicos, constituem também, muito provavelmente, espécies distintas. Estas leveduras apresentam sequências da região D1/D2 distintas de uma terceira estirpe, Cont.NA L (Figura 3.6), estudada paralelamente a este trabalho, isolada a partir do ar (contaminação numa placa com meio de cultura) e com uma macromorfologia semelhante. Fisiologicamente, *Cryptococcus* sp. nov. 3 distingue-se de todas as outras espécies deste grupo pela incapacidade de assimilação de L-arabinose (Tabela 3.4 e Apêndice III). Outra característica que distingue *Cryptococcus* sp. nov. 2 e *Cryptococcus* sp. nov. 3 de todas as outras leveduras deste grupo é a forte capacidade de hidrólise do amido. A primeira destas duas espécies consegue assimilar glicerol como fonte de carbono e energia, ao contrário de *Cryptococcus* sp. nov. 3 (Tabela 3.4 e Apêndice III). Não foi detectada em qualquer destas estirpes a produção de balistoconídios.

As restantes estirpes deste grupo cuja sequência nucleotídica da região D1/D2 foi determinada inserem-se num grupo com suporte estatístico que contém as espécies *D. crocea*, *D. aurantiaca*, *D. hungarica*, *D. zsoldii* e *Cr. statzelliae* (Figura 3.6). Verifica-se que algumas dessas estirpes apresentam sequências idênticas à da estirpe tipo de *D. hungarica*

(PYCC 3954^T), incluindo também a estirpe tipo de *B. armeniaca*. A conspecificidade entre *Cr. hungaricus* e *B. armeniaca*, agora *D. hungarica*, foi confirmada por outros autores com a realização de experiências de reassociação DNA/DNA (Bai *et al.* 2002a, Takashima *et al.* 2001) e confirmada no nosso laboratório, tendo sido obtidas percentagens de homologia DNA/DNA entre estas duas espécies da ordem dos 94% (L. Portugal, resultados não publicados). A semelhança entre os perfis de MSP-PCR apresentados por várias das estirpes caracterizadas e os obtidos para a estirpe tipo de *D. hungarica* fazia já supor esta conspecificidade (Figura 3.5). Foi observada a produção de balistoconídios com um eixo de simetria em todas as estirpes de *D. hungarica* caracterizadas, não tendo sido observada a formação de quaisquer estruturas sexuadas.

Com seis diferenças na sequência nucleotídica da região D1/D2 em relação a *D. hungarica* encontramos a espécie *Dioszegia* sp. nov. 3 (4AVF6) (Figura 3.6). Estas duas espécies agrupam-se com base estatística. Fisiologicamente, *D. hungarica* e *Dioszegia* sp. nov. 3 distinguem-se das outras leveduras deste grupo pela incapacidade de assimilar melibiose e lactose como fontes de carbono e energia (Tabela 3.4 e Apêndice III). Entre estas duas espécies existem, além das diferenças na região D1/D2, outras diferenças na sua fisiologia, nomeadamente na assimilação de L-sorbose, D-arabinose, glicerol, *myo*-inositol e nitrito, no crescimento sem vitaminas e na sensibilidade a 100 ppm de cicloheximida (Tabela 3.4 e Apêndice III).

Na árvore filogenética da Figura 3.6 observa-se ainda a formação de um grupo que contém as espécies *Dioszegia* sp. nov. 1 e *Dioszegia* sp. nov. 2, as duas variedades de *D. zsoldii* e uma outra estirpe, designada por *D. cf. zsoldii*. Foram obtidas as sequências da região ITS para os elementos deste grupo (Figura 3.7). As três estirpes de *Dioszegia* sp. nov. 1 apresentam sequências da região ITS idênticas, o que sugere a sua conspecificidade (Figura 3.7). Foi observada a produção de balistoconídios em algumas das estirpes (Figura 3.5). Das duas estirpes sujeitas a testes fisiológicos de identificação, 5AVFs3 assimila muito menos compostos, incluindo glucose, do que a sua congénere A2AVV2 (Apêndice III), apesar das características moleculares investigadas apontarem para a sua conspecificidade. Os dados conjuntos da sequenciação das regiões D1/D2 (Figura 3.6) e ITS (Figura 3.7) apontam para uma separação de *Dioszegia* sp. nov. 2, tendo sido observada nestas estirpes a produção de balistoconídios (Figura 3.5). Não foi detectada a formação de estruturas sexuadas após cruzamento entre estas estirpes em diversos meios de cultura.

As duas variedades de *D. zsoldii* e as estirpes designadas por *D. cf. zsoldii* formam um grupo com suporte estatístico (Figura 3.7). As duas variedades de *D. zsoldii* apresentam valores intermédios de homologia de DNA genómico (Bai *et al.* 2002a), tendo sido descritas como

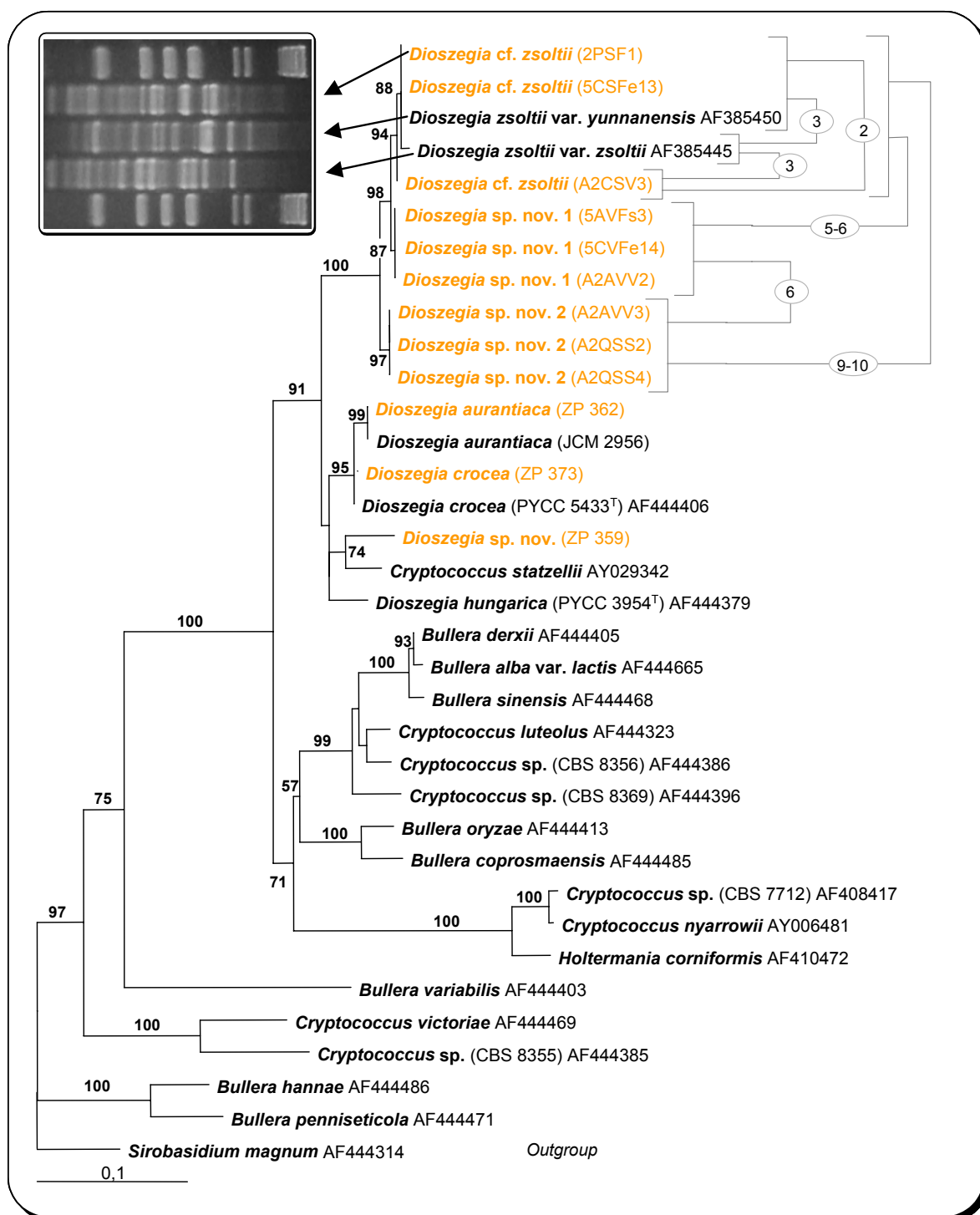


Figura 3.7. Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA de leveduras produtoras de colônias de cor laranja, e outras espécies da linhagem Tremellales, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente. As sequências determinadas neste estudo estão realçadas a laranja. Nalguns casos é indicado o número de bases diferentes entre as sequências de algumas estirpes. São representados os perfis de MSP-PCR, com o *primer* M13, para algumas estirpes de um grupo taxonomicamente menos resolvido.

produzindo balistoconídios. Os seus perfis de assimilação de fontes de carbono e azoto são similares, com a excepção da assimilação de D-manitol, positivo para a variedade *zsoltii* e negativo para a variedade *yunnanensis*. Propõe-se que as estirpes 2PSF1, 5CSFe13 e A2CSV3 pertençam à espécie *D. zsoltii*, sendo designadas apenas por *D. cf. zsoltii*, enquanto não se proceder a estudos de reassociação DNA/DNA. Não foi observada produção de balistoconídios nestas estirpes, que assimilam *myo*-inositol como fonte de carbono, características que contrastam com as evidenciadas pelas duas variedades de *D. zsoltii*. A sequência da região ITS sugere ainda, pelo menos para 2PSF1 e 5CSFe13, que estas estirpes correspondem a *D. zsoltii* var. *yunnanensis* (Figura 3.7). No entanto, a variedade *yunnanensis* foi descrita como não sendo capaz de assimilar D-manitol como fonte de carbono, característica que a distingue da variedade *zsoltii*, e discrepante em relação às estirpes caracterizadas neste trabalho (Apêndice III). De realçar que os perfis de MSP-PCR das duas variedades de *D. zsoltii* e 2PSF1 são também diferentes (Figura 3.7).

Incluídas também no grupo em análise, embora não tendo sido estudadas neste trabalho (L. Portugal, resultados não publicados), as estirpes ZP 362, ZP 359 e ZP 373 não são conspecíficas com qualquer das leveduras isoladas das folhas das plantas da Serra da Arrábida (Figuras 3.6 e 3.7). Os resultados da sequenciação da região D1/D2 do rDNA 26S indicam que a estirpe ZP 49 é conspecífica com *D. hungarica* (Figura 3.6).

Linhagem Tremellales – Bulleromyces sp. nov., Bullera spp. e Cryptococcus spp.

Foram isoladas a partir do filoplano cerca de 170 estirpes de levedura cujas culturas são brancas ou cremes, de textura cremosa ou mucosa, e caracterizadas pela incapacidade de utilização de nitrato como fonte de azoto, capacidade de assimilação de *myo*-inositol e D-glucuronato, e pela produção de compostos amiláceos extracelulares. Esta combinação de características fazia supor que estas estirpes se encontravam relacionadas com membros da linhagem Tremellales (Tabela 3.2). Algumas leveduras com características semelhantes foram ainda isoladas das flores, sementes e solo junto das plantas estudadas. Foi observada a produção de balistoconídios com um eixo de simetria para algumas destas estirpes. Quando estas estruturas aparecem em leveduras anamórficas desta linhagem presume-se que se trata de espécies do género *Bullera*. Se não são observados balistoconídios estamos em presença, na maior parte dos casos, de estirpes pertencentes ao género *Cryptococcus*. Devido ao elevado número de leveduras isoladas, não foi possível realizar um trabalho sistemático de caracterização deste grupo. Algumas estirpes foram, no entanto, estudadas em maior detalhe, o que envolveu a realização de testes morfológicos,

fisiológicos e bioquímicos e, por vezes, a obtenção das sequências da região D1/D2 do rDNA 26S. Na Tabela 3.5 apresenta-se uma listagem das leveduras estudadas.

Tabela 3.5. Leveduras não pigmentadas caracterizadas pertencentes à linhagem Tremellales, classe Himenomicetas, e respectiva origem

Espécie	Estirpe	Origem
<i>Bullera</i> sp.	PYCC 4534	<i>Zelkova</i> sp.
<i>B. alba</i>	B1QVS2	Folha seca de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	A1CVS3	Folha seca de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
<i>B. sinensis</i>	A2QSSI1*	Folha seca de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
<i>B. cf. variabilis</i>	A1PSV2	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)
	A2PSS2	Folha seca de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)
	A6PVVI3	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Bulleromyces</i> sp. nov.	2AVF3*	Folha de <i>Acer monspessulanum</i> (Serra da Arrábida, Portugal)
	A1CVV1*	Folha de <i>Cistus albidus</i> (Serra da Arrábida, Portugal)
	A2AVS4*	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Serra da Arrábida, Portugal)
	A2AVS5*	<i>Idem</i>
<i>Bulleromyces</i> sp. nov.	A2AVS6	<i>Idem</i>
	A2QVSI1*	Folha de <i>Quercus faginea</i> (Serra da Arrábida, Portugal)
	A5QSV2	<i>Idem</i>
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 4	2QVF12*	Folha de <i>Quercus faginea</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 5	3CSF7*	Folha de <i>Cistus albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	3CVF15*	<i>Idem</i>
	6CSF2*	<i>Idem</i>
	1CSF7*	<i>Idem</i>
	5ArS9	Ar, Mata do Solitário (Arrábida, Portugal)
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 6	B3QVV2*	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 7	2CSF4*	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	2QVF19	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 8	B3QSV3a*	<i>Idem</i>
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 12	2MV3*	Medronhos (Arrábida, Portugal)
	1QVL2*	Flor de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Cryptococcus</i> cf. sp. nov. 12	1AVL2*	Flor de <i>Acer monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 13	1PVL1*	Flor de <i>Pistacia lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 14	1OSS5*	Solo na Mata do Solitário (Arrábida, Portugal)
	1OSF1	Folha de <i>Osyris quadripartita</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 15	6ArS1a*	Ar, Mata do Solitário (Arrábida, Portugal)
<i>Cr. cf. laurentii</i>	1CVM1	Sementes de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	2ArS3	Ar, Mata do Solitário (Arrábida, Portugal)
	2CSF10	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	2CVF14	<i>Idem</i>
	2CVF15	<i>Idem</i>
	2CVFm13	<i>Idem</i>
	2QVF23	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	3CVF14	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	4QVF25	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	5ArS3	Ar, Mata do Solitário (Arrábida, Portugal)
	5QSF22	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	6AVF1	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	6CVFmeio6	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	A1QSV1	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	A3CSVI3A	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	A3CSVI4	<i>Idem</i>
<i>Cr. dimennae</i>	2CVF21*	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)

*Estirpes seleccionadas para sequenciação da região D1/D2 do rDNA 26S.

Sete das estirpes eram caracterizadas pela produção de balistoconídios com um eixo de simetria, do tipo dos produzidos por *Bullera* spp., e pela produção de um pigmento escuro que se difundia para o meio de cultura PDA quando as culturas eram mantidas a 4 °C. Da realização de cruzamentos entre estas estirpes resultou a formação de micélio com ansas de anastomose e de basídios (Figura 3.8), verificando-se que as estirpes A2AVS4 e A2AVS6 (m.t A1) eram compatíveis com A1CVV1, 2AVF3, A2QVSI1, A2AVS5 e A5QSV2 (m.t A2). A estirpe PYCC 4534 não cruzou com nenhuma destas estirpes. Neste grupo, observou-se ainda uma certa homogeneidade dos perfis de bandas obtidas por MSP-PCR

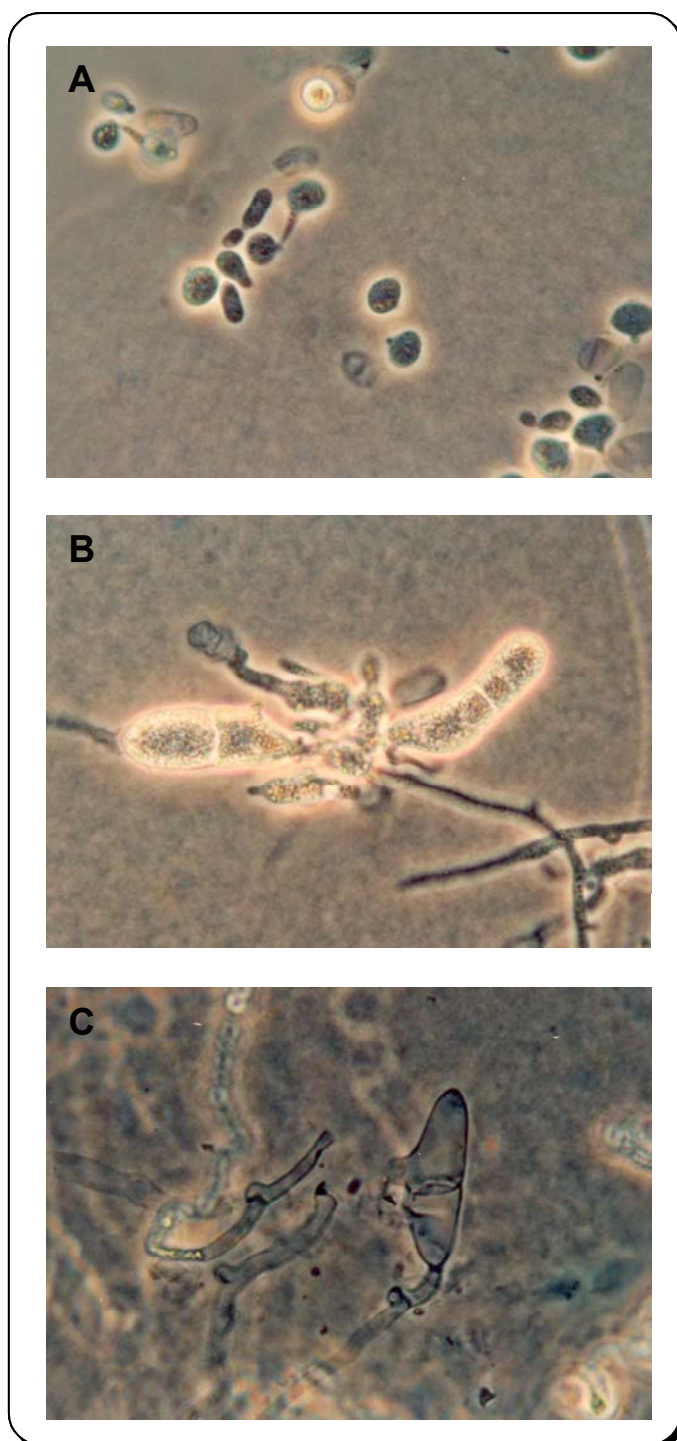


Figura 3.8. Estruturas da fase sexuada de *Bulleromyces* sp. nov., resultantes do cruzamento das estirpes A2AVS4 e A2QVSI1, após um mês de incubação em meio CMA sólido: **A** – células e balistoconídeos, **B** – início de formação dos basídios, e **C** – basídios e ansa de anastomose. Micro-fotografias em contraste de fase (gentilmente cedidas por José Paulo Sampaio).

com o *primer* M13, com a excepção de PYCC 4534 (Figura 3.9). Esta última estirpe difere ainda das restantes, entre várias características, na assimilação de salicina, inulina, D-glucitol, crescimento sem vitaminas, sensibilidade a 100 ppm de cicloheximida e na produção de compostos amiláceos.

A Figura 3.10 representa uma árvore filogenética deste grupo de estirpes e de estirpes de referência baseada na análise de sequências da região D1/D2 do rDNA 26S. As sequências da região D1/D2 de A1CVV1, 2AVF3, A2AVS5 e A2QVSI1 são idênticas, e a de A2AVS4 apresenta uma inserção nucleotídica nesta região. A estirpe PYCC 4534 apresenta três substituições nucleotídicas nesta região em relação às estirpes anteriores.

Foram realizadas experiências de reassociação DNA/DNA entre as estirpes A2AVS4, A2QVSI1 e PYCC 4534, registando-se valores intermédios para a reassociação entre A2AVS4 e PYCC 4534 (~ 55%), e entre A2QVSI1 e PYCC 4534 (~ 54%), e valores elevados de homologia entre A2AVS4 e A2QVSI1 (~ 93%).

Com base nos dados anteriores, propõe-se a descrição da espécie teleomórfica *Bulleromyces* sp. nov., incluindo as estirpes A2AVS4, A2AVS6, A1CVV1, 2AVF3, A2QVSI1, A2AVS5 e A5QSV2. A escolha do nome deste género deve-se à observação da produção de balistoconídios com um eixo de simetria e à formação de basídios septados. Estas estirpes encontram-se filogeneticamente próximas de *Bulleromyces albus*, apesar do grupo a que pertencem não ter suporte estatístico (Figura 3.10). É possível que a classificação adoptada venha a sofrer alterações no futuro, uma vez que outros fungos dimórficos teleomórficos se encontram filogeneticamente próximos destas estirpes, nomeadamente alguns membros do género *Tremella* (Figura 3.10). Os dados de sequenciação da região D1/D2, de interfertilidade e de MSP-PCR sugerem que a estirpe PYCC 4534 representa outra espécie distinta, ou uma variedade, de acordo com os valores intermédios de homologia DNA/DNA observados.

Várias outras leveduras da linhagem Tremellales foram caracterizadas (Tabela 3.5) através dos seus perfis de assimilação de compostos de carbono e azoto (Apêndice III) e, para algumas, pela determinação da sequência nucleotídica da região D1/D2 do rDNA 26S. Muitas das estirpes para as quais apenas se realizaram os testes fisiológicos foram denominadas *Cr. cf. laurentii*. Não tendo sido possível caracterizar estas estirpes utilizando métodos moleculares, optou-se por incluí-las na espécie *Cr. laurentii*, reconhecidamente heterogénea e que apenas recentemente foi objecto de um estudo taxonómico mais detalhado (Sugita *et al.* 2000). De notar que esta espécie é referida frequentemente como habitante comum do filoplano (ver Cap. I). Estas estirpes apresentam perfis de

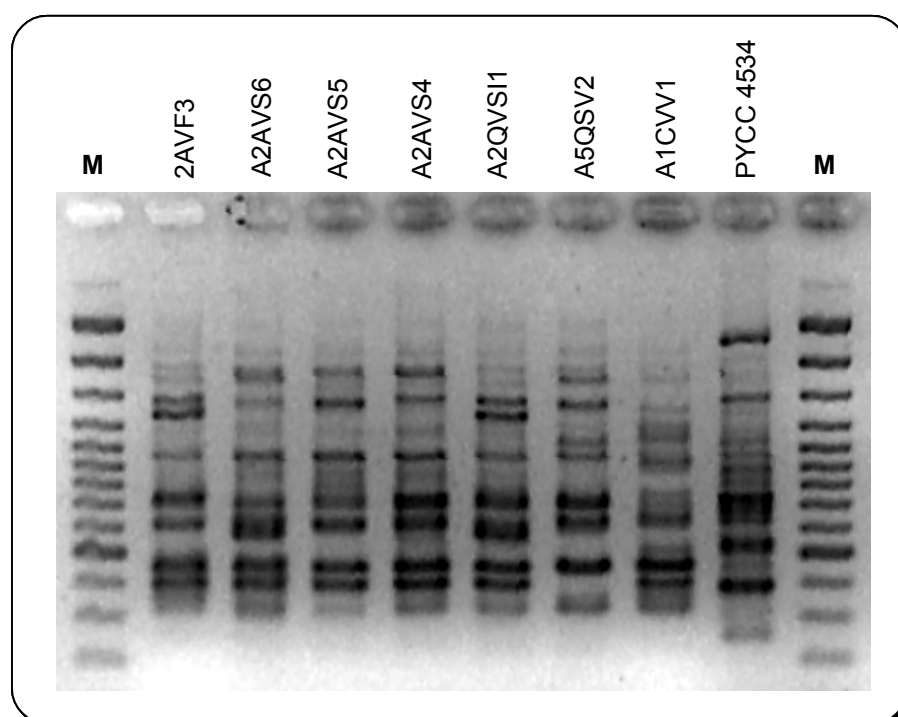


Figura 3.9. Perfis de bandas de DNA obtidas por MSP-PCR com o *primer* M13 para estirpes de *Bulleromyces* sp. nov. e PYCC 4534. **M** – Marcador de DNA (*GenerulerTM DNA ladder mix*).



Figura 3.10. Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de leveduras da linhagem Tremellales, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente. As sequências determinadas neste estudo estão realçadas a laranja.

utilização de fontes de carbono e azoto variáveis (Apêndice III), e muitas assimilam alguns compostos aromáticos, característica rara entre a maioria dos membros das Tremellales. Outras estirpes a que apenas se aplicaram os testes fisiológicos foram B1QVS2 e A1CVS3, identificadas como *B. alba*, anamorfo de *Bu. albus*. Os resultados destes testes diferem dos de outras estirpes de referência de *Bu. albus*, apesar de pelo menos B1QVS2 ser sexualmente compatível com estas. As estirpes A1PSV2, A2PSS2 e A6PVVI3 foram identificadas como *B. cf. variabilis*, produzindo os característicos balistoconídios com forma angular.

Entre as estirpes para as quais foi obtida a sequência da região D1/D2 do rDNA 26S (Figura 3.10), A2QSSI1 produz balistoconídios e apresenta uma sequência idêntica à de *B. sinensis* (e à do seu sinónimo *B. derxii*) e 2CVF21 corresponde a *Cr. dimennae*. Vários isolados não representam espécies reconhecidas e são estirpes únicas: 2QVF12 (*Cryptococcus* sp. nov. 4), 6ArS1a (*Cryptococcus* sp. nov. 15), B3QVV2 (*Cryptococcus* sp. nov. 6), 2CSF4 (*Cryptococcus* sp. nov. 7), B3QSV3a (*Cryptococcus* sp. nov. 8), 1PVL1 (*Cryptococcus* sp. nov. 13) e 1OSS5 (*Cryptococcus* sp. nov. 14). Esta separação é baseada nas diferenças significativas encontradas nas sequências nucleotídicas da região D1/D2 destas leveduras em relação às espécies mais próximas (Figura 3.10). Um caso interessante é o da espécie designada por *Cryptococcus* sp. nov. 5, aparentemente não muito distante de *Cryptococcus* sp. nov. 1 discutida anteriormente, com cinco estirpes, quatro das quais isoladas a partir de folhas de *Ci. albidus* em diferentes amostragens. Estas estirpes são também fenotipicamente homogêneas, formando culturas brancas de textura bastante mucosa. Apresentam ainda a característica de assimilarem os ácidos gálico e gentísico, não muito comum entre as Tremellales (Apêndice III). Num agrupamento com as estirpes de *Cryptococcus* sp. nov. 13 e *Cryptococcus* sp. nov. 14, encontramos um conjunto de três estirpes que também não provêm do filoplano: 1AVL2, 1QVL2 e 2MV3 (Figura 3.10). Enquanto 1QVL2 e 2MV3 apresentam um perfil fisiológico semelhante (Apêndice III), 1AVL2 deu resultados discrepantes (assimilação de sorbose, metil-glucósido, glicerol e ácido L-tartárico, e utilização de nitrito como fonte de azoto). Por agora, propõe-se a conspecificidade de 1QVL2 e 2MV3 (*Cryptococcus* sp. nov. 12) e um estatuto provisório para a estirpe 1AVL2 como *Cryptococcus* cf. sp. nov. 12. Estas estirpes apresentam ainda a capacidade, rara nesta linhagem, de utilizarem o composto aromático ácido protocatecuico como fonte de carbono e energia.

De referir que foram isoladas dos mesmos locais de amostragem dezenas de estirpes da linhagem Tremellales que ainda não foram caracterizadas.

Linhagem Filobasidiales

No decurso do trabalho de isolamento de leveduras do filoplano foram recolhidas cerca de 40 estirpes de cor branca, creme ou rosada, de textura cremosa ou mucosa, com a capacidade de utilização de nitrato como fonte de azoto e de inositol como fonte de carbono, presumivelmente pertencentes à linhagem das Filobasidiales da classe Himenomicetas (ver Tabela 3.2). Nesta linhagem, as leveduras distribuem-se, essencialmente, pelo género anamórfico *Cryptococcus* e, se for observada a fase sexuada, *Filobasidium*. Na Tabela 3.6 estão listadas as estirpes de levedura caracterizadas, tendo sido seguida uma metodologia semelhante à utilizada para o estudo das leveduras produtoras de colónias de cor laranja da linhagem Tremellales.

Tabela 3.6. Leveduras caracterizadas da linhagem Filobasidiales, classe Himenomicetas, e respectiva origem

Espécie	Estirpe	Origem
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 9	2CVF20	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	2QSF8	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	5QVF15	<i>Idem</i>
	A2CVV3	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 10	4QVF20	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 11	A4QVVI10	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Cryptococcus</i> sp. nov. 18	2MV5	Medronho (Arrábida, Portugal)
	4ExS4	Exsudado de árvore (Arrábida, Portugal)
<i>Cr. aerius</i>	1CVF1	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	1OSF2	Folha de <i>O. quadripartita</i> (Arrábida, Portugal)
	3ArV2	Ar, Fonte do Veado (Arrábida, Portugal)
<i>Cr. albidisimilis</i>	2OSF1	Folha de <i>Osyris quadripartita</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Cr. chernovii</i>	PYCC 4629 ^T	Folha seca de <i>Artemisia</i> sp. (Uzbequistão)
<i>Cr. magnus</i>	2QVF1	Folha de <i>Quercus faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	4AVF24	Folha de <i>Acer monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	5AVF18	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	5CVFe15	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	5QSF10	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	A2CVV1	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	2CVFm20	Folha de <i>Cistus albidus</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Cr. oeirensis</i>	2CVFm7	<i>Idem</i>
	A1CVS1	Folha seca de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	A2CVV2	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Cr. wieringae</i>	2CSFm2	<i>Idem</i>
	5AVF1	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	5AVFs18	<i>Idem</i>
<i>Filobasidium</i> sp. nov.	2CVF5	Folha de <i>Cistus albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	3CSF10	<i>Idem</i>
	3CVF34	<i>Idem</i>
	5CSF1	<i>Idem</i>
	6CVF16	<i>Idem</i>
	6CVF9	<i>Idem</i>
<i>Filobasidium</i> cf. sp. nov.	3CSF16	<i>Idem</i>
	3CVF17	<i>Idem</i>
	6CVFsup2	<i>Idem</i>
<i>F. globisporum</i>	PYCC 5451	Folha de <i>Yucca brevifolia</i> (USA)

Na Figura 3.11 apresenta-se um dendrograma construído a partir da análise dos perfis de bandas de MSP-PCR, utilizando o *primer* M13, para as leveduras listadas na Tabela 3.6, com a excepção de 2MV5 e de 4ExS4. A partir desta análise, foram seleccionadas estirpes com perfis diferentes para a sequenciação da região D1/D2 do rDNA 26S e, em alguns casos, da região ITS. Foram também seleccionadas algumas estirpes para a aplicação dos testes de identificação convencionais fisiológicos e bioquímicos. As Figuras 3.12 e 3.13

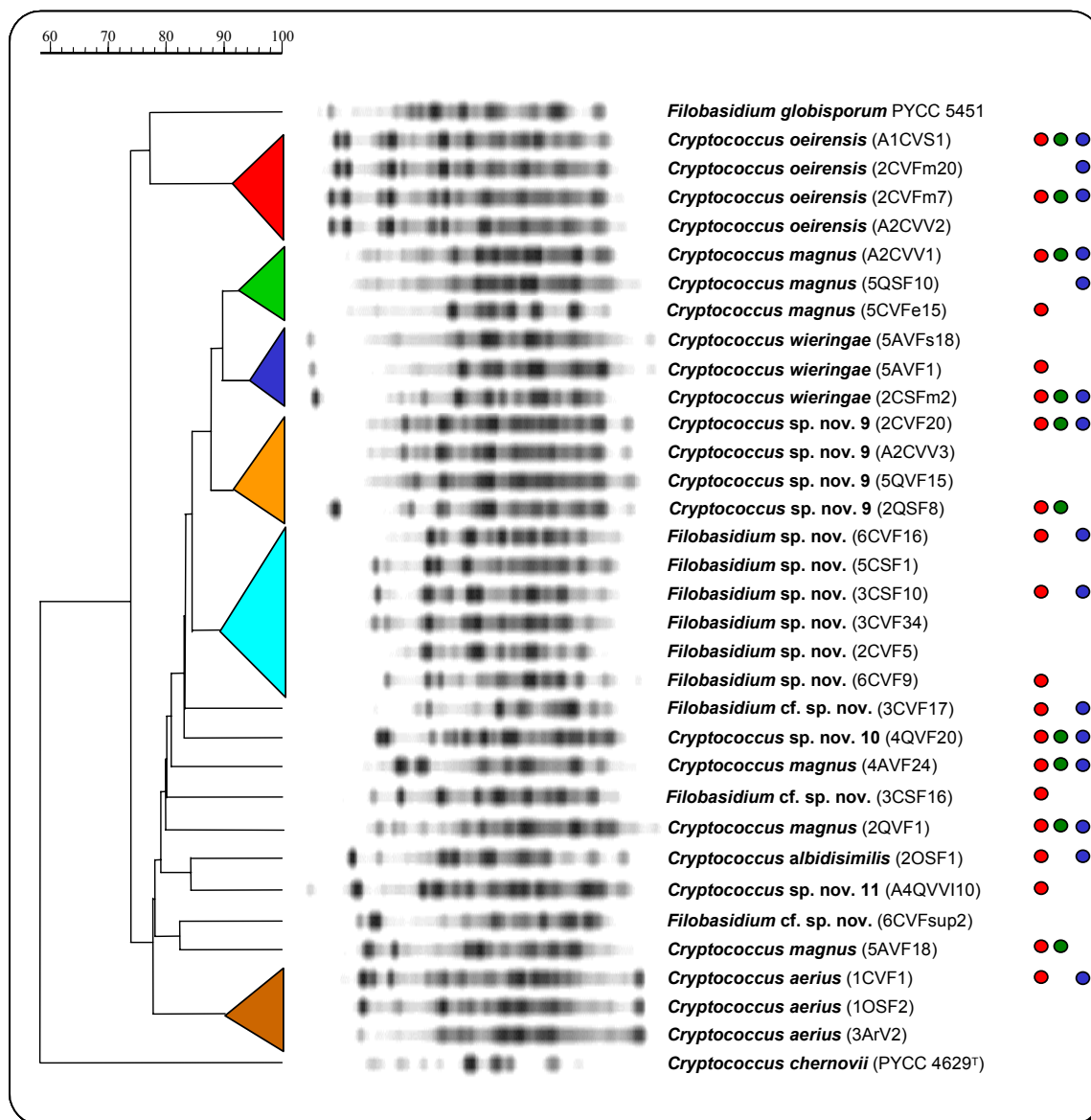


Figura 3.11. Dendrograma de isolados de leveduras da classe Himenomicetas, linhagem Filobasidiales, construído com base na comparação de perfis de bandas de DNA obtidas por MSP-PCR com o *primer* M13 (Coeficiente de Pearson; programa informático GelCompar). T – Estirpe Tipo; ● – Estirpe seleccionada para sequenciação da região D1/D2; ● – Estirpe seleccionada para sequenciação da região ITS; ● – Estirpe para a qual foi realizada a identificação fenotípica completa.

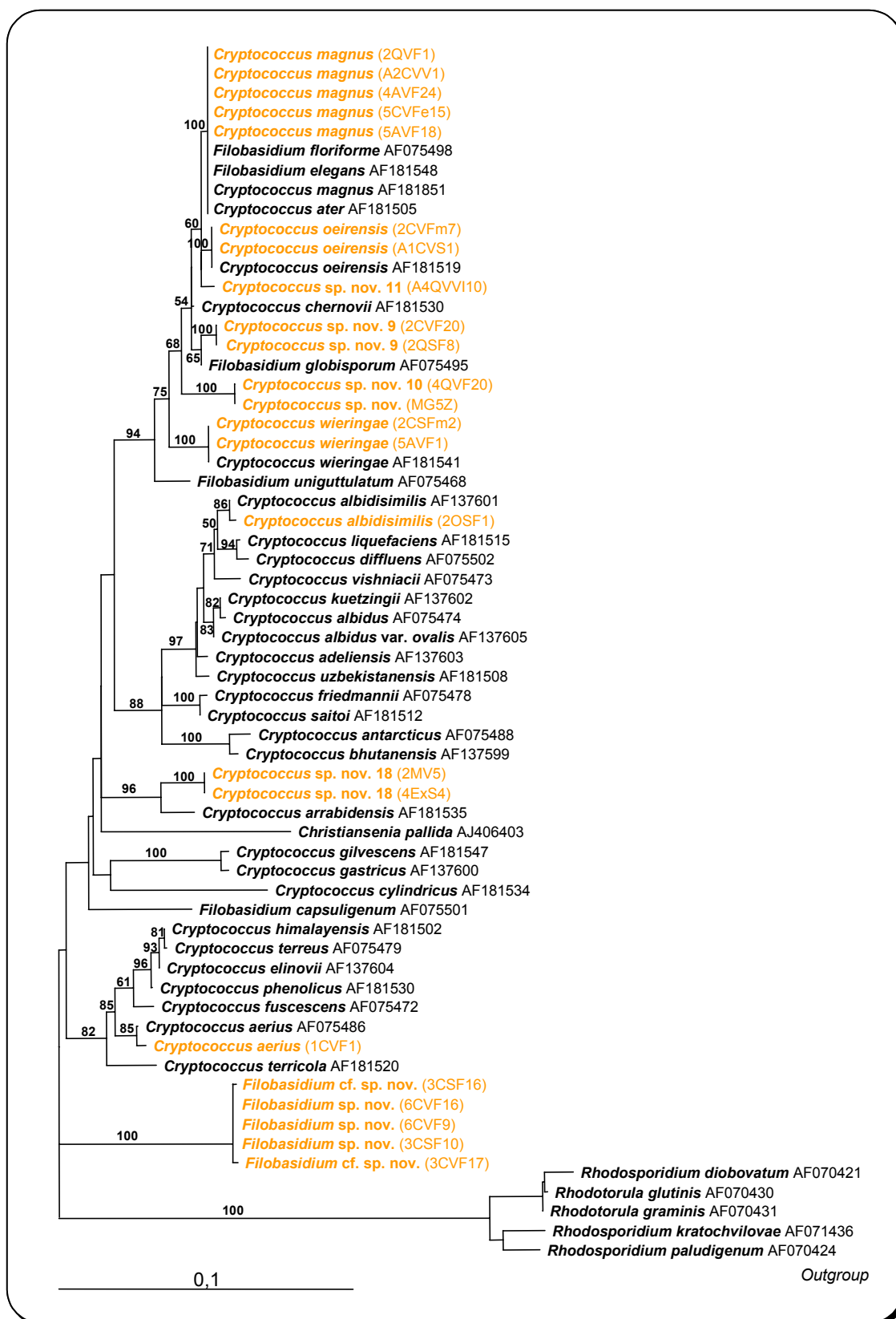


Figura 3.12. Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de leveduras da linhagem Filobasidiales, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente. As sequências determinadas neste estudo estão realçadas a laranja.

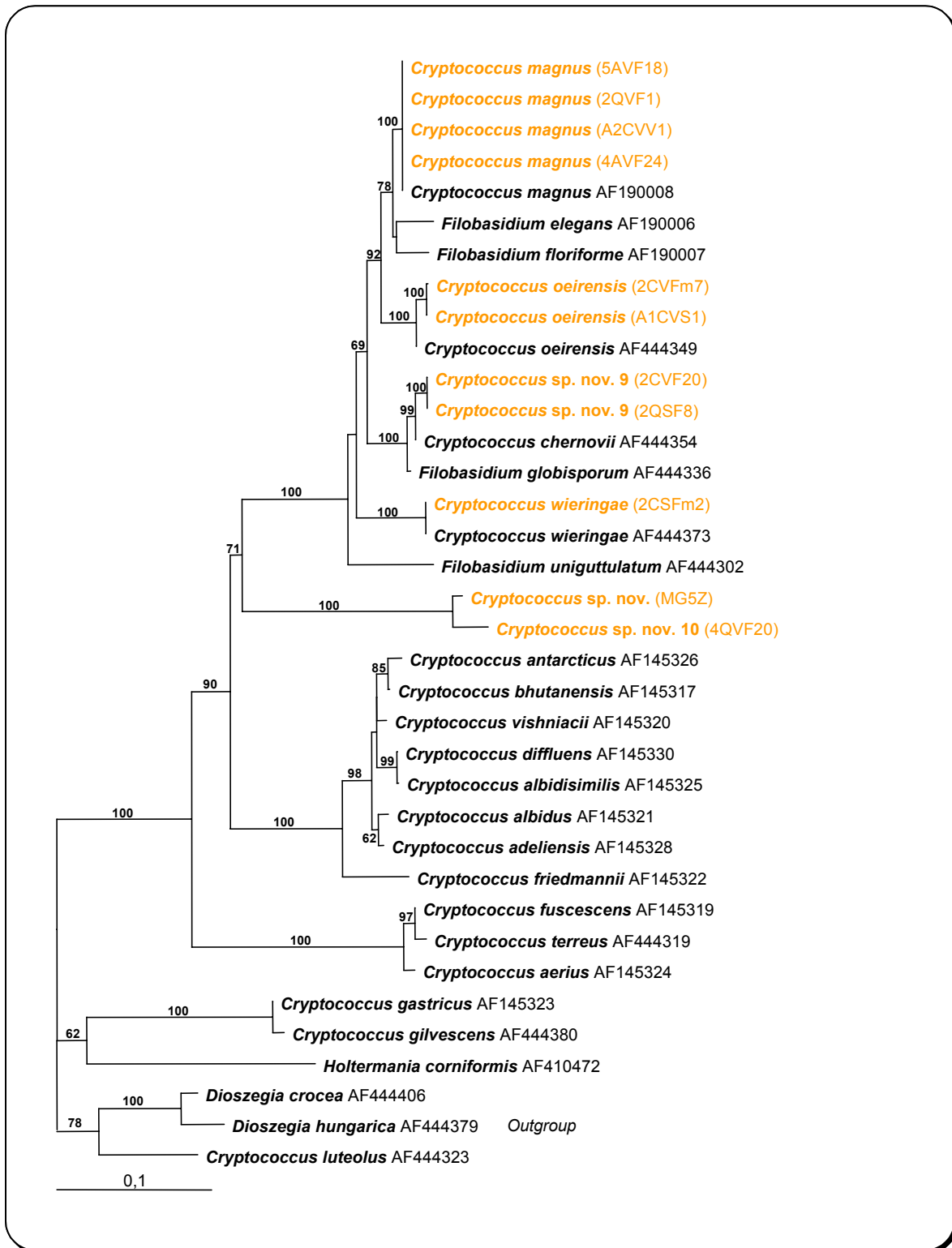


Figura 3.13. Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA de leveduras da linhagem Filobasidiales, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente. As sequências determinadas neste estudo estão realçadas a laranja.

representam duas árvores filogenéticas baseadas na análise de sequências da região D1/D2 e ITS, respectivamente, para membros da linhagem Filobasidiales.

As estirpes designadas por *Filobasidium* sp. nov. constituem um grupo de leveduras caracterizadas pela formação de colónias de textura bastante mucosa, com uma cor rosada, curiosamente todas isoladas de folhas de *Ci. albidus* em amostragens e locais diferentes. A análise de perfis de bandas de MSP-PCR agrupou cinco destas estirpes com perfis mais homogêneos: 6CVF16, 5CSF1, 3CSF10, 3CVF34, 2CVF5 e 6CVF9 (Figura 3.11). De fora deste grupo ficaram as estirpes 3CVF17, 3CSF16 e 6CVFsup2. As diferentes estirpes foram cruzadas aos pares em diversos meios de cultura (PDA, MYP e CMA), verificando-se que algumas delas eram compatíveis entre si, produzindo micélio com ansas de anastomose e basídios (Figura 3.14). Verificou-se que no cruzamento de 6CVF16 ou 6CVF9 (m.t.A) com qualquer uma das outras estirpes - 3CVF34, 2CVF5, 5CSF1 ou 3CSF10 (m.t.B) havia produção de micélio e de basídios não septados com uma morfologia típica do género *Filobasidium*. Nos cruzamentos entre qualquer destas estirpes e uma das estirpes 3CVF17, 3CSF16 ou 6CVFsup2, nunca foi detectada a formação de estruturas sexuadas. Na análise filogenética das sequências da região D1/D2 (Figura 3.12), observa-se que as estirpes de *Filobasidium* sp. nov. formam um grupo basal à linhagem Filobasidiales, com suporte estatístico. Propõe-se uma espécie teleomórfica, *Filobasidium* sp. nov., que inclua as estirpes compatíveis entre si e com sequências da região D1/D2 iguais. As estirpes sexualmente incompatíveis são designadas por *Filobasidium* cf. sp. nov., ficando a aguardar a realização de mais estudos, incluindo experiências de reassociação DNA/DNA, para esclarecer o seu estatuto taxonómico.

A conspecificidade de 2QVF1, A2CVV1, 4AVF24, 5AVF18 e 5CVFe15 com *Cr. magnus* é inferida pelos resultados da sequenciação das regiões D1/D2 e/ou ITS do rDNA, iguais aos da estirpe tipo desta espécie (Figuras 3.12 e 3.13), apesar dos perfis de MSP-PCR bastante heterogêneos (Figura 3.11). A estirpe 5QSF10 apresentou um perfil de MSP-PCR semelhante ao de A2CVV1 (Figura 3.11), pelo que foi também incluída na espécie *Cr. magnus*. As estirpes 2CVFm7, 2CVFm20, A2CVV2 e A1CVS1, com base nos perfis de MSP-PCR (Figura 3.11) e sequenciação das regiões D1/D2 e ITS (Figuras 3.12 e 3.13), foram identificadas como *Cr. oeirensis*.

As estirpes 2OSF1 e 1CVF1 parecem corresponder a *Cr. albidisimilis* e *Cr. aerius*, respectivamente. A primeira apresenta apenas uma diferença na sequência da região D1/D2 em relação à estirpe tipo de *Cr. albidisimilis*, e 1CVF1 duas diferenças em relação à estirpe tipo de *Cr. aerius* (Figura 3.12). Tanto a cultura de 1CVF1 como a de outras duas estirpes com perfis de MSP-PCR semelhantes, 1OSF2 e 3ArV2 (Figura 3.11), apresentam uma cor

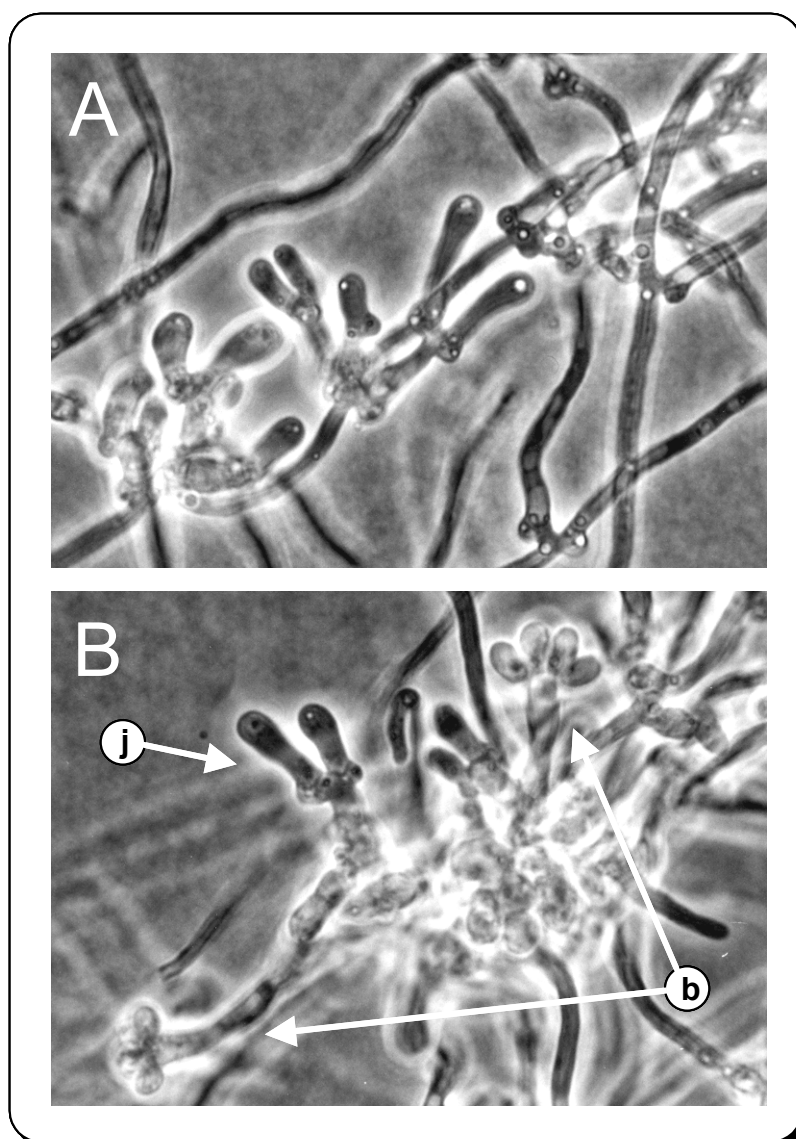


Figura 3.14. Estruturas da fase sexuada de *Filobasidium* sp. nov. resultantes do cruzamento das estirpes 3CSF10 e 6CVF16, após um mês de incubação em meio MYP sólido: **A** – formação de micélio com ansas de anastomose e basídios jovens; **B** – basídios jovens (j) e basídio com basidiósporos (b).

amarelada, muito característica das estirpes de *Cr. aerius*, embora esta espécie seja mais frequentemente isolada do solo (p.e. Fonseca *et al.* 2000). Todos os dados moleculares obtidos para as estirpes 5AVFs18, 5AVF1 e 2CSFm2 (Figuras 3.11, 3.12 e 3.13) conferem com os da estirpe tipo de *Cr. wieringae*.

Isolados de levedura com perfis de MSP-PCR únicos também não se integram em espécies já descritas quando se procede à análise das sequências da região D1/D2 e/ou ITS (4QVF20/*Cryptococcus* sp. nov. 10 e A4QVVI10/*Cryptococcus* sp. nov. 11). A estirpe 4QVF20 constitui um caso interessante, uma vez que possui uma sequência da região D1/D2 idêntica à da estirpe MG5Z (Figura 3.12), estudada paralelamente, mas as duas estirpes diferem significativamente nas sequências da região ITS (mais de 16 diferenças, Figura 3.13) e a nível fisiológico, nomeadamente na capacidade de assimilação de etanol, ácidos mícico e vanílico, utilização de L-lisina como fonte de azoto e capacidade de crescimento com 1000 ppm de cicloheximida (Apêndice III). Com perfis de MSP-PCR semelhantes entre si, mas distintos das espécies *Cr. chernovii* e *F. globisporum* (Figura 3.11), foram caracterizadas quatro estirpes designadas por *Cryptococcus* sp. nov. 9 (Figuras 3.12 e 3.13). Com base apenas nas sequências da região D1/D2, as estirpes 2MV5 e 4ExS4 parecem representar uma nova espécie designada por *Cryptococcus* sp. nov. 18, que agrupa com *Cr. arrabidensis*, mas da qual difere em 15 bases nucleotídicas (Figura 3.12).

Linhagem Cystofilobasidiales

Foram isoladas das folhas poucas leveduras relacionadas com a linhagem Cystofilobasidiales, a maioria correspondendo ao género *Udeniomyces*, com capacidade de produção de balistoconídios globosos com um eixo de simetria, e que apenas foram sujeitas a uma caracterização fisiológica e bioquímica convencional (Apêndice III).

Foi, no entanto, isolada do solo próximo do arbusto *O. quadripartita* na Serra da Arrábida uma estirpe de levedura, designada 1OSS1, interessante por conseguir produzir homotalicamente todo o seu ciclo de vida sexuado com produção de teliósporos e basídios (Figura 3.15). Parece representar uma nova espécie do género *Cystofilobasidium*, com uma sequência da região D1/D2 do rDNA 26S que difere em mais de oito nucleótidos de todas as outras espécies de *Cystofilobasidium* reconhecidas. Na Figura 3.16 apresenta-se uma árvore filogenética com esta nova espécie entre outros membros da linhagem Cystofilobasidiales.

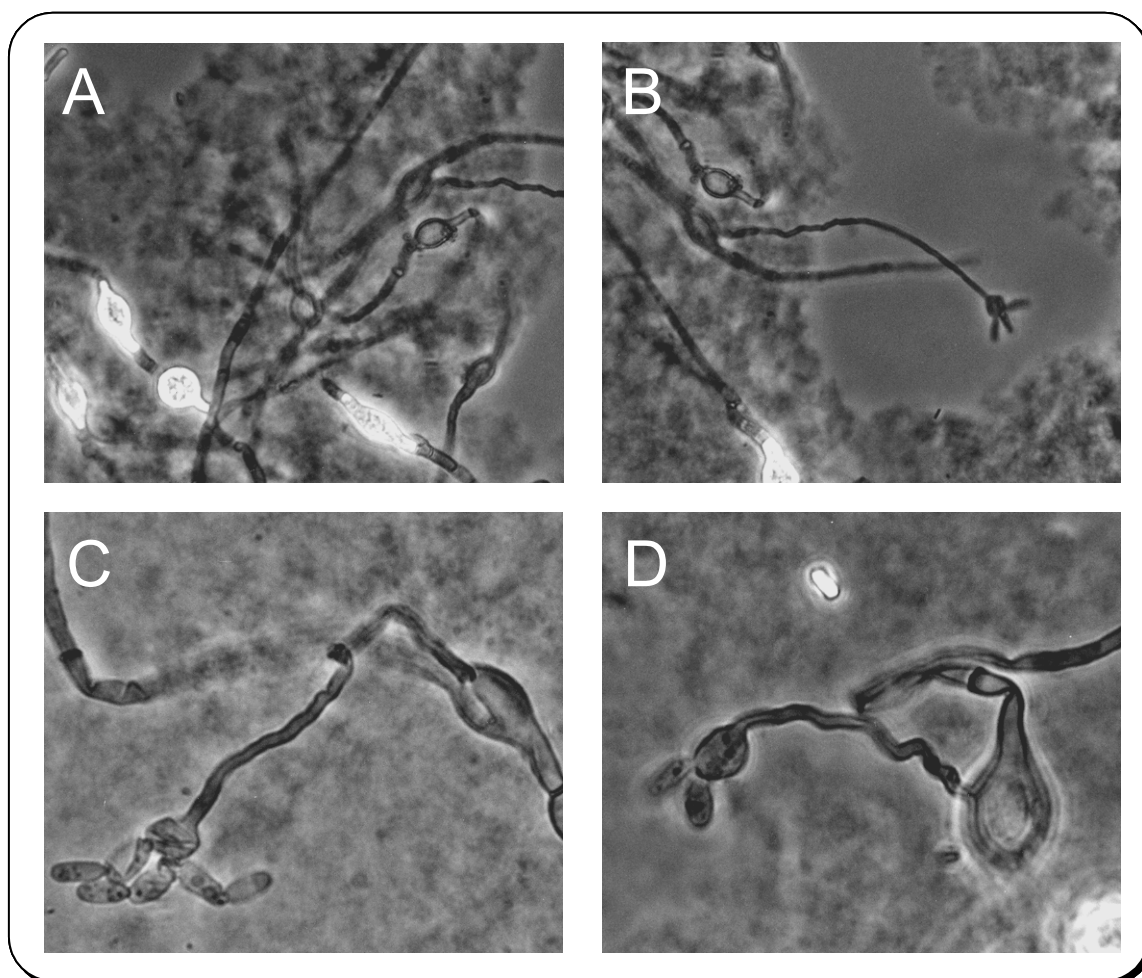


Figura 3.15. Estruturas da fase sexuada de *Cystofilobasidium* sp. nov. (1OSS1), após um mês de incubação em meio MYP sólido: **A** – formação de micélio e teliósporos; **B, C, D** – basídios com basidiósporos.

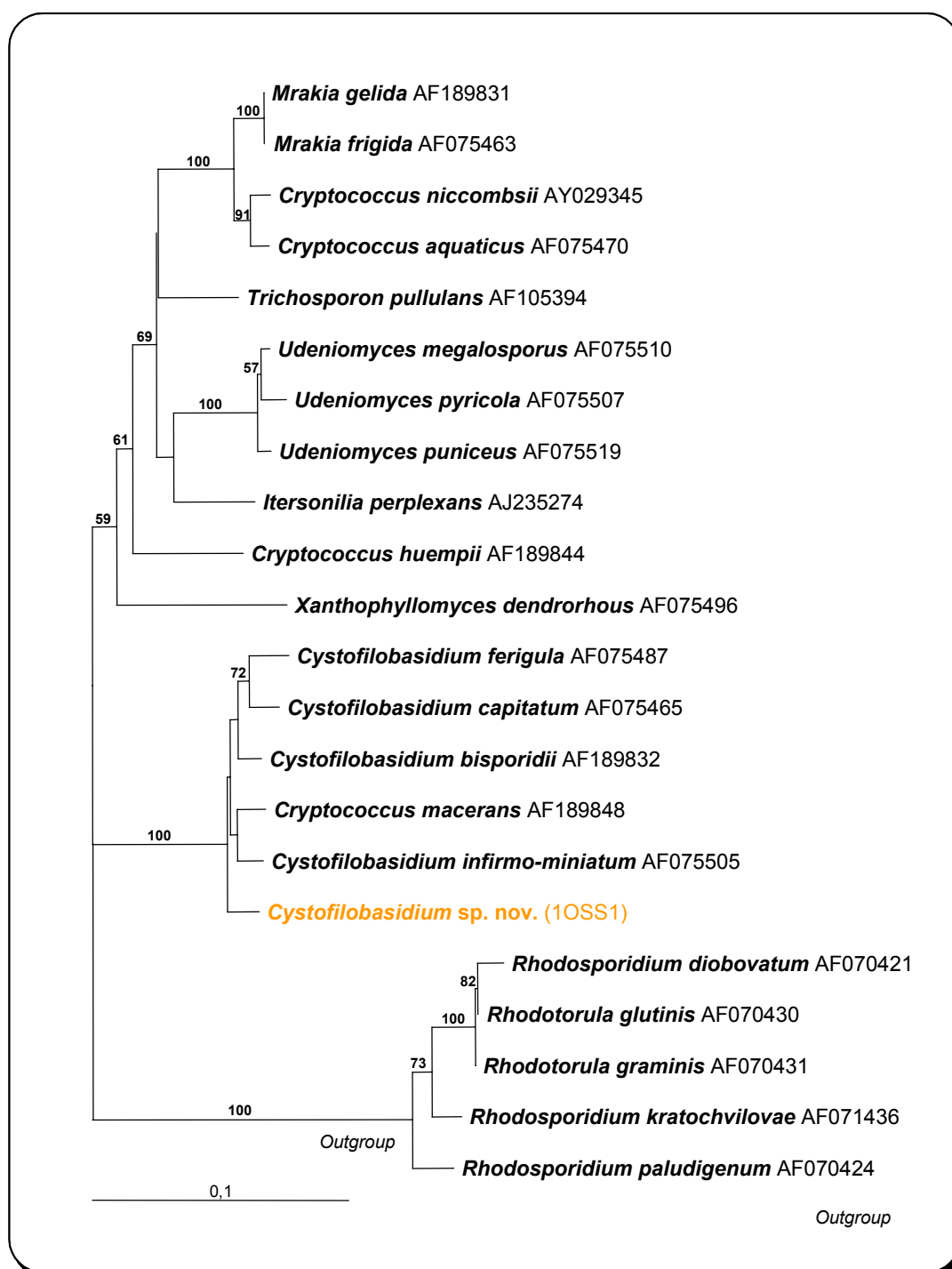


Figura 3.16. Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de membros da linhagem Cystofilobasidiales, classe Himenomicetas, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente. As sequências determinadas neste estudo estão realçadas a laranja.

III.3.2. Taxonomia de isolados da classe Urediniomycetas

Linhagem Erythrobasidium

Cerca de 350 estirpes de levedura, isoladas essencialmente a partir do filoplano, pertencem à classe dos fungos urediniomicetas, linhagem *Erythrobasidium*. Formam colónias pigmentadas de cor laranja, rosa ou avermelhada, de textura geralmente cremosa ou pastosa, não produzem compostos amiláceos extracelulares e não assimilam inositol como fonte de carbono e energia (ver Tabela 3.2). As leveduras anamórficas pertencentes a esta linhagem distribuem-se pelos géneros *Sporobolomyces*, que produzem balistoconídios com um plano de simetria, ou *Rhodotorula*.

Devido à sua abundância no filoplano das plantas estudadas, foi caracterizado um elevado número destas estirpes. Foi utilizada uma abordagem semelhante à já descrita, incluindo estirpes de referência para comparação (Tabela 3.7). Verificou-se que as leveduras estudadas se distribuem, essencialmente, por quatro grupos no interior da linhagem *Erythrobasidium* que, por conveniência, são aqui denominados como grupo *Sporobolomyces gracilis* (Sg), grupo *Rh. aurantiaca* (Ra), grupo *Erythrobasidium hasegawianum* (Eh) e grupo *Rh. minuta* (Rm).

Grupo *Sporobolomyces gracilis* e *Rhodotorula aurantiaca*

Na Figura 3.17 apresenta-se um dendrograma de estirpes relacionadas com os grupos *Sp. gracilis* e *Rh. aurantiaca* com base nos perfis de bandas de DNA obtidas por MSP-PCR com o *primer* M13. Observa-se a formação de grupos de estirpes que, de um modo geral, deverão corresponder a espécies distintas. No entanto, com a excepção dos perfis semelhantes apresentados pelo par estirpe tipo de *Sp. salicinus* (PYCC 5500^T) e estirpe A5AVSI5, e pelo agrupamento de *Sp. coprosmae* (PYCC 5417^T) com outras seis estirpes, permitindo a presumível identificação dos isolados, os perfis de todas as outras leveduras deste grupo não eram semelhantes aos das estirpes de referência utilizadas.

As sequências nucleotídicas da região D1/D2 de A5AVSI5 e de *Sp. salicinus* são também idênticas (Figura 3.18), o que concorda com a hipótese de conspecificidade. De salientar que A4QSV15 também apresenta uma sequência da região D1/D2 idêntica à da estirpe tipo desta espécie, apesar de apresentar um perfil de MSP-PCR diferente (Figura 3.17). A macromorfologia de todas estas estirpes é também semelhante, formando culturas de textura pastosa e de cor laranja claro. Foi também observada a produção de balistoconídios, não se tendo detectado a produção de quaisquer estruturas sexuadas.

Tabela 3.7. Leveduras caracterizadas da linhagem *Erythrobasidium*, classe Urediniomycetas, e respectiva origem

Espécie	Estirpe	Origem	Grupo
<i>Erythrobasidium hasegawianum</i>	JCM 1545 ^T	Cultura envelhecida de levedura de cerveja (USA)	Eh
<i>Ery. cf. hasegawianum</i> A1	2CVFm21	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	3PVF3	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	5CVF18	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	6PSF3	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
<i>Ery. cf. hasegawianum</i> A2	5OSF8	Folha de <i>O. quadripartita</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	5QSF20	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	6PVF6	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
<i>Ery. cf. hasegawianum</i> B	2CSF8	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	3CSF14	<i>Idem</i>	Eh
	3CSF4	<i>Idem</i>	Eh
	3CVF18	<i>Idem</i>	Eh
	3CVF19	<i>Idem</i>	Eh
	3PVF2	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	5CSF2	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	6CSF5	<i>Idem</i>	Eh
	6CVF6	<i>Idem</i>	Eh
<i>Ery. cf. hasegawianum</i> C	1PVF4	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
<i>Ery. cf. hasegawianum</i> D	2CVFm22	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	5AVF7	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	5QVF14	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	6CVF30	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
<i>Ery. cf. hasegawianum</i> E	5ArS3	Ar, Mata do Solitário (Arrábida, Portugal)	Eh
	6CladSF3	Folha de <i>Cistus ladanifer</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
<i>Ery. cf. hasegawianum</i> F	1PSF1	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	2AVF1	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	2PSF5	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	3CSF15	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	3CVF12	<i>Idem</i>	Eh
	3PVF6	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	3QSF1	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	4AVF3	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	5OSF7	Folha de <i>O. quadripartita</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	5PVF10	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	6OSF1	Folha de <i>O. quadripartita</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	A1AVS1	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	A3CVV12	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
<i>Ery. cf. hasegawianum</i> G	2AVF19	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
<i>Occultifur externus</i>	PYCC 4817 ^T	Manta morta (Portugal)	Rm
<i>Rhodotorula</i> sp. nov. 1	5CVF4	Folha de <i>Cistus albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Rm
<i>Rhodotorula</i> sp. nov. 2	2CVF13	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Rm
	5ArS5	Ar, Mata do Solitário (Arrábida, Portugal)	Rm
<i>Rhodotorula</i> sp. nov. 3	5QSF18	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
<i>Rhodotorula</i> sp. nov. 4A	2QSF10	<i>Idem</i>	Ra
	4AVF5	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)	Ra
	5AVFs11	<i>Idem</i>	Ra
	5AVFs13	<i>Idem</i>	Ra
	5QVF12	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)	Ra
	6QVF3b	<i>Idem</i>	Ra
<i>Rhodotorula</i> sp. nov. 4B	2AVF17	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)	Ra
	6PSF2	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Ra
<i>Rhodotorula</i> sp. nov. 11	3ArV4	Ar, Fonte do Veado (Arrábida, Portugal)	Eh
<i>Rh. armeniaca</i>	PYCC 4852 ^T	Folha de <i>Callistemon viminalis</i> (Austrália)	Ra
<i>Rh. aurantiaca</i>	PYCC 4582 ^T	Ar, Japão	Ra
<i>Rh. cf. aurantiaca</i>	PYCC 4703	Larva (Portugal)	Ra
	2CVFm12	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Ra
<i>Rh. laryngis</i>	CBS 2221 ^T	Isolado clínico de laringe (Noruega)	Rm
<i>Rh. marina</i>	PYCC 5050 ^T	Camarão (Golfo do México)	Sg
<i>Rh. minuta</i>	PYCC 4790 ^T	Ar, Japão	Rm
<i>Rh. pallida</i>	PYCC 4888 ^T	Nódulo fúngico num rato	Rm
<i>Rh. slooffiae</i>	CBS 5706 ^T	Isolado clínico, garganta (Hungria)	Rm
<i>Rh. cf. slooffiae</i>	1PVF1	Folha de <i>Pistacia lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Rm
	2CVFm10	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Rm
	2QSF2	Folha de <i>Quercus faginea</i> (Arrábida, Portugal)	Rm
	3CVF25	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Rm
	3PVF1	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Rm
	4AVF1	Folha de <i>Acer monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)	Rm
	5AVF3	<i>Idem</i>	Rm
	5PSF2	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Rm
	6QSF4	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)	Rm
	A2CSV2	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Rm
	A5QVV1	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)	Rm

Tabela 3.7 (continuação)

Espécie	Estirpe	Origem	Grupo
<i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 1A	2CSFm5	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	2CVF18	<i>Idem</i>	Sg
	2PVF6	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	2PVF9	<i>Idem</i>	Sg
	2QVF14	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	5AVFs22	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
<i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 1B	5PVF2	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	5CVF8	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	6PVF21	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	A6PVV15	<i>Idem</i>	Sg
	2AVF26	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
<i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 1C	2CSF9	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
<i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 2	2CVFm24	<i>Idem</i>	Sg
	A2AVV9	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	A2OSV2	Folha de <i>Osyris quadripartita</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	A3CSVI5	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	A3CSVI7	<i>Idem</i>	Sg
	2PVF14	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
<i>Sporobolomyces</i> sp. nov. 3 <i>Sp. coprosmae</i>	PYCC 5417 ^T	Folha de <i>Coprosma tenuifolia</i> (Nova Zelândia)	Sg
	2QVF20b	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	A1CSV3	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	A2AVV8b	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	A3PVV1	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	A5QSV6	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
<i>Sp. elongatus</i>	B1PVSC2	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	2PSM1	Semente de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
	5OSF12	Folha de <i>O. quadripartita</i> (Arrábida, Portugal)	Eh
<i>Sp. foliicola</i>	PYCC 5364 ^T	Folha de <i>Banksia collina</i> (Austrália)	Sg
<i>Sp. gracilis</i>	PYCC 5420 ^T	Folha em decomposição	Sg
<i>Sp. cf. gracilis</i> A	2AVF12	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	2CSFm9	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	2PVF8	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	5AVFs2	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	5PSF3	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	5PVF11	<i>Idem</i>	Sg
	A10SV1	Folha de <i>O. quadripartita</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	A2PSV1	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	A3CVV13	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	A5AVS7	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	A5QSV9	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	A6PVV2	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)	Sg
	B1PVSA1	<i>Idem</i>	Sg
	A2PVV2	<i>Idem</i>	Sg
	A3PVV2	<i>Idem</i>	Sg
<i>Sp. kluyveri-nielli</i>	PYCC 5365 ^T	Folha de <i>Dombeya rotundifolia</i> (África do Sul)	Ra
<i>Sp. oryzicola</i>	PYCC 5423 ^T	Folha morta de <i>Oryza sativa</i> (Japão)	Sg
<i>Sp. phyllomatis</i>	PYCC 5368 ^T	Folha de <i>Dombeya rotundifolia</i> (África do Sul)	Ra
<i>Sp. salicinus</i>	PYCC 5500 ^T	Folha de <i>Salix</i> sp. (Canada)	Ra
	A4QSV15	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)	Ra
<i>Sp. vermiculatus</i>	JCM 10224 ^T	Folha de <i>Pennisetum pedicellatum</i> (Bangkok)	Sg
<i>Sp. yunnanensis</i>	JCM 10687 ^T	Folha semi-seca de <i>Sapindus delavayi</i> (China)	Eh
	A5AVSI5	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)	Eh

Muitas das leveduras isoladas neste trabalho foram primeiro identificadas presumptivamente como *Rh. aurantiaca*, de acordo com os resultados da caracterização fisiológica. Após um estudo mais aprofundado destas estirpes não foi possível encontrar uma única que pudéssemos assegurar ser conspecífica com *Rh. aurantiaca*. Com perfis de MSP-PCR semelhantes entre si, mas distintos dos da estirpe tipo de *Rh. aurantiaca* (Figura 3.17), encontramos as estirpes 2CVFm12 e PYCC 4703, que formam colónias de cor laranja claro e com textura pastosa. A sequência D1/D2 do rDNA 26S de 2CVFm12 apresenta duas

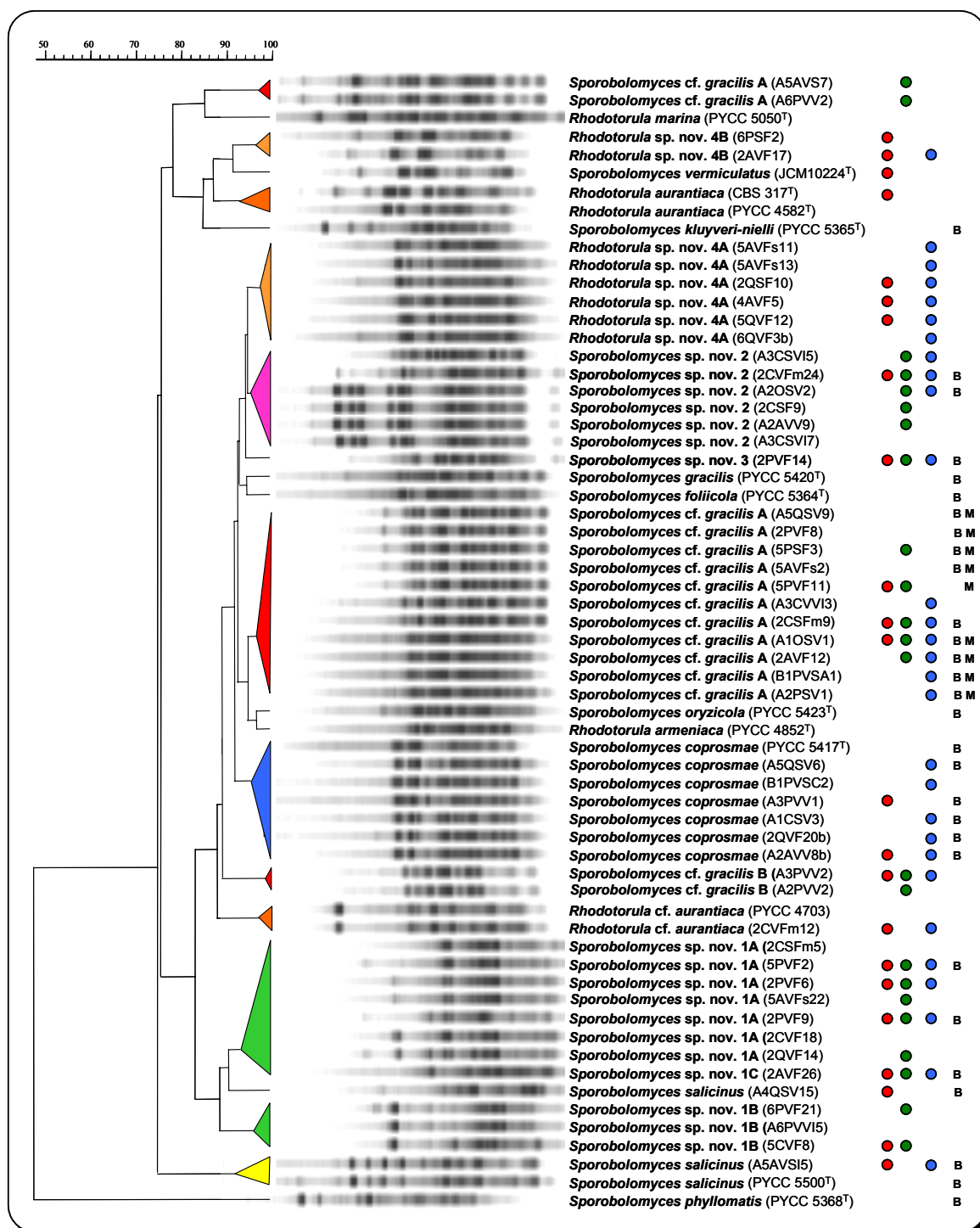


Figura 3.17. Dendrograma de isolados de leveduras da classe Urediniomycetes, linhagem *Erythrobasidium*, relacionadas com o grupo *Sporobolomyces gracilis* e *Rhodotorula aurantiaca*, construído com base na comparação de perfis de bandas de DNA obtidos por MSP-PCR com o *primer* M13 (Coeficiente de Pearson; programa informático GelCompar). T – Estirpe Tipo; ● – Estirpe seleccionada para sequenciação da região D1/D2; ● – Estirpe seleccionada para sequenciação da região ITS; ● – Estirpe para a qual foi realizada a identificação fenotípica completa; B – Produção de balistoconídios; M - Produção de micélio.

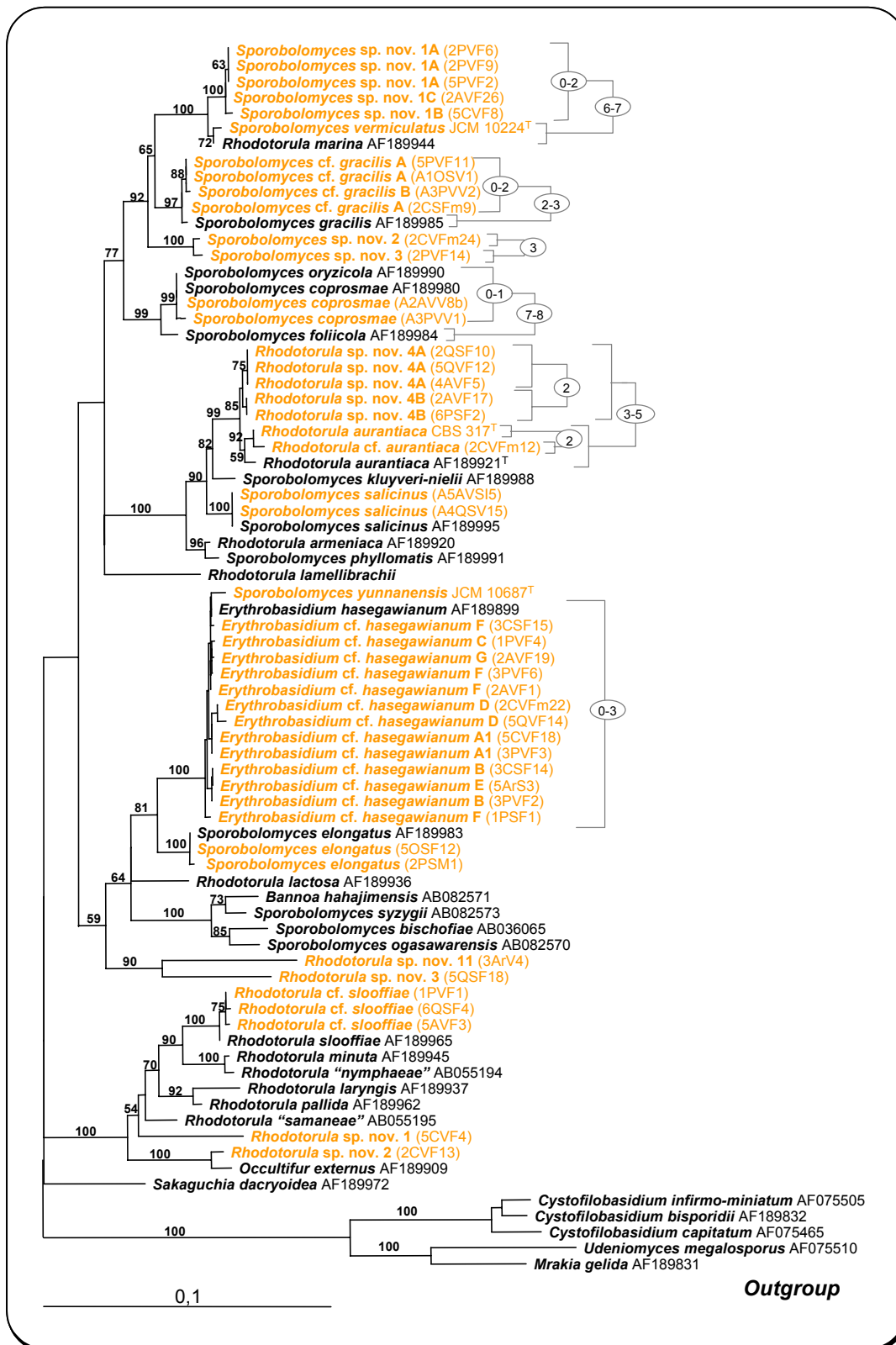


Figura 3.18. Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de membros da linhagem Erythrobasidium, classe Urediniomycetes, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente. As sequências determinadas neste estudo estão realçadas a laranja. Nalguns casos é indicado o número de bases diferentes entre as sequências de algumas estirpes.

substituições em relação à sequência da estirpe tipo de *Rh. aurantiaca* CBS 317^T (Figura 3.18), não se excluindo portanto a sua conspecificidade. Carecendo da confirmação com outros testes, as duas estirpes 2CVFm12 e PYCC 4703 são, assim, denominadas *Rh. cf. aurantiaca*. Filogeneticamente próximo de *Rh. aurantiaca*, mas correspondendo, provavelmente, a uma espécie distinta, encontra-se um grupo de estirpes designadas por *Rhodotorula* sp. nov. 4 (Figura 3.18), de aspecto morfológico semelhante às anteriores e divididas em dois sub-grupos com base nos perfis de MSP-PCR apresentados (Figura 3.17): *Rhodotorula* sp. nov. 4A, que compreende as estirpes 5AVFs11, 5AVFs13, 2QSF10, 4AVF5, 5QVF12 e 6QVF3b, e *Rhodotorula* sp. nov. 4B, que inclui as estirpes 2AVF17 e 6PSF2. Fisiologicamente, *Rhodotorula* sp. nov. 4 diferencia-se de *Rh. cf. aurantiaca* (2CVFm12) na assimilação de galactitol e etanol como fontes de carbono (Apêndice III). Os dois sub-grupos A e B de *Rhodotorula* sp. nov. 4 são fisiologicamente indistinguíveis. Propõe-se a criação de pelo menos uma nova espécie, *Rhodotorula* sp. nov. 4, sendo necessário realizar mais testes, nomeadamente a sequenciação da região ITS e a determinação do grau de homologia do DNA genómico, para melhor avaliar se os dois sub-grupos A e B são conspecíficos ou se representam espécies distintas.

Um grupo de estirpes produtoras de balistoconídios forma colónias muito semelhantes às da estirpe tipo de *Sp. coprosmae* (PYCC 5417^T), de textura algo pastosa, mas a tender para mucosa na sua periferia, e de uma cor rosa escuro a tender para creme também na periferia das colónias. A semelhança entre os correspondentes perfis de MSP-PCR (Figura 3.17) sugeriu a sua conspecificidade, confirmada pela análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do rDNA 26S (Figura 3.18) que apresentavam no máximo uma diferença. Após cruzamentos entre estas estirpes, observou-se, em alguns casos, a formação de micélio com ansas de anastomose verdadeiras (Figura 3.19), mas nunca se detectou a produção de basídios, pelo que é sugerida a manutenção do nome *Sp. coprosmae* até à elucidação do seu ciclo de vida completo. Verificou-se que as estirpes A3PVV1, PYCC 5417^T, B1PVSC2 e A2AVV8b (m.t. A) são compatíveis com 2QVF20b e A1CSV3 (m.t. B), tendo sido observada a formação do referido micélio em meio MYP ao fim de 15 dias de incubação. Não se observou a formação de estruturas sexuadas no cruzamento entre A5QSV6 ou PYCC 5423^T (estirpe tipo de *Sp. oryzicola*) com qualquer uma das estirpes compatíveis encontradas. As espécies *Sp. oryzicola* e *Sp. coprosmae* apresentam perfis de MSP-PCR semelhantes (Figura 3.17) e sequências da região D1/D2 idênticas (Figura 3.18). A região ITS das estirpes tipo diferem em quatro nucleótidos (Scorzettii *et al.* 2002), sendo os valores de homologia do DNA genómico da ordem dos 50% (Hamamoto e Nakase 1995).

Um número considerável de estirpes surgiu filogeneticamente próximo de *Sp. gracilis* (Figura 3.18), apesar das diferenças observadas nos perfis de MSP-PCR apresentados por

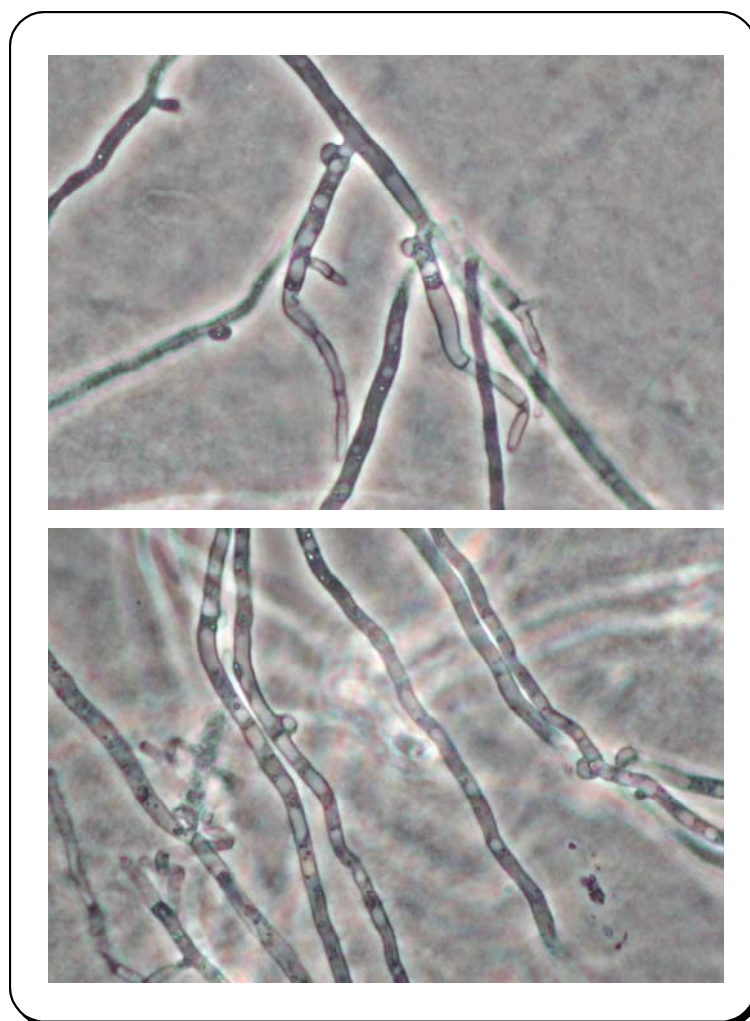


Figura 3.19. Micélio com ansas de anastomose resultante do cruzamento entre A3PVV1 e A1CSV3, identificadas como *Sporobolomyces coprosmae*, após um mês de incubação em meio MYP sólido.

algumas destas estirpes, incluindo a estirpe tipo desta espécie (Figura 3.17). Com perfis de MSP-PCR muito homogêneos entre si, agrupam-se 11 estirpes designadas por *Sp. cf. gracilis* A (Figura 3.17). Com perfis um pouco diferentes, as estirpes A5AVS7 e A6PVV2 foram também incluídas neste grupo devido à semelhança das respectivas sequências nucleotídicas das regiões ITS (Figura 3.20). Com perfis diferentes dos anteriores, as estirpes A2PVV2 e A3PVV2 foram incluídas num outro grupo relacionado, denominado *Sp. cf. gracilis* B (Figura 3.17). Foi observada a produção de micélio verdadeiro e de balistoconídios em grande parte dos membros de *Sp. cf. gracilis* A. Fisiologicamente, *Sp. cf. gracilis* A e B não se distinguem entre si (Apêndice III). Macromorfológicamente, todas as estirpes produzem colónias de cor rosa muito escuro, com textura pastosa. Os dois grupos diferem em dois nucleótidos na região D1/D2 do rDNA 26S. A análise das sequências da região ITS (Figura 3.20) mostrou existir um máximo de quatro substituições nucleotídicas em relação à estirpe tipo de *Sp. gracilis*. Sugere-se, assim, que sejam designadas por *Sp. cf. gracilis* até à realização de testes adicionais, nomeadamente experiências de reassociação DNA/DNA.

Um outro grupo de 11 estirpes, apesar de alguma heterogeneidade nos seus perfis de MSP-PCR, parece representar uma nova espécie, *Sporobolomyces* sp. nov. 1, que se sub-divide em três sub-grupos A, B e C (Figura 3.17). Foi observada a produção de balistoconídios em algumas destas estirpes que, de um modo geral, produzem colónias de textura pastosa, com uma cor rosa alaranjado escuro. Estas estirpes são filogeneticamente próximas de *Sp. vermiculatus* e de *Rh. marina*, com as quais formam um agrupamento com suporte estatístico (Figura 3.18). A análise da região ITS concorda mais ou menos com a formação destes sub-grupos (Figura 3.20). A determinação do grau de homologia DNA/DNA entre alguns pares de estirpes poderá elucidar se os sub-grupos A, B e C representam variações intraspecíficas ou representarão espécies distintas. De realçar que grande parte das estirpes desta nova espécie crescem muito lentamente e, muitas vezes, apenas apresentam crescimento em meio com glucose se este for suplementado com extracto de levedura. Exemplos de estirpes com deficiências no crescimento são 2QVF14, 2CSFm5, 2CVF18, 2PVF9 (*Sporobolomyces* sp. nov. 1A) e 2AVF26 (*Sporobolomyces* sp. nov. 1C).

A análise dos perfis de MSP-PCR agrupou um conjunto de estirpes que se designou por *Sporobolomyces* sp. nov. 2 (Figura 3.17). Estão filogeneticamente relacionadas com a estirpe 2PVF14, designada por *Sporobolomyces* sp. nov. 3 (Figuras 3.18 e 3.20), tendo sido observada a produção de balistoconídios por algumas destas estirpes (Figura 3.17), que produzem colónias de textura pastosa e cor rosa escuro. A árvore filogenética baseada na análise das sequências da região D1/D2 do rDNA 26S (Figura 3.18) mostrou que as estirpes 2CVFm24 (*Sporobolomyces* sp. nov. 2) e 2PVF14 (*Sporobolomyces* sp. nov. 3) formam um grupo suportado estatisticamente e as respectivas sequências diferem em três nucleótidos,

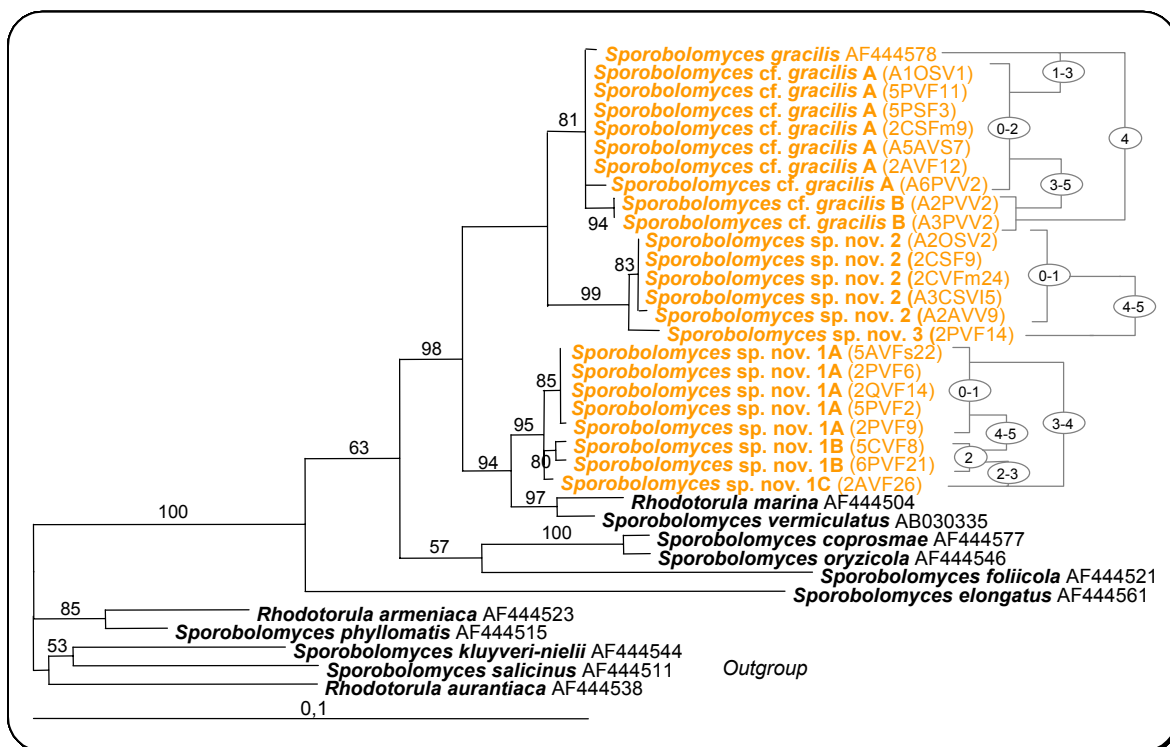


Figura 3.20. Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA de leveduras relacionadas com *Sporobolomyces gracilis* e *Rhodotorula aurantiaca*, linhagem *Erythrobasidium*, classe *Urediniomycetes*, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente. As sequências determinadas neste estudo estão realçadas a laranja. Nalguns casos é indicado o número de bases diferentes entre as sequências de algumas estirpes.

o que sugere estarmos perante espécies distintas. A análise das sequências da região ITS, para um número mais alargado de estirpes deste grupo, veio apoiar esta hipótese (Figura 3.20). Fisiologicamente, as duas novas espécies apresentam diferenças, consideradas relevantes, na utilização de D-gluconato e D-glucuronato como fontes de carbono e energia (Apêndice III).

Grupo *Erythrobasidium hasegawianum*

A espécie *Ery. hasegawianum* é representada apenas por uma estirpe, caracterizada pela formação de basídios e sem produção de teliósporos (Sugiyama e Hamamoto 1998). No entanto, Sampaio *et al.* (1999) descrevem que as estruturas interpretadas como basídios por aqueles autores se devem tratar de células conidiogénicas e que *Ery. hasegawianum* não se trata portanto de uma espécie teleomórfica. Esta estirpe produz colónias com uma cor laranja-avermelhada, não produz balistoconídios e forma micélio septado, com ou sem ansas de anastomose. Filogeneticamente próxima desta, foi recentemente descrita uma nova espécie produtora de balistoconídios, *Sp. yunnanensis* (Bai *et al.* 2001). Próxima de ambas as espécies está também *Sp. elongatus*. Na Figura 3.21 apresenta-se um dendrograma construído a partir da análise dos perfis de bandas de DNA obtidos por MSP-PCR com o *primer* M13. Aí se pode observar um grupo alargado de isolados que se verificou estarem filogeneticamente próximos de *Ery. hasegawianum* (Figura 3.18). Apesar da formação de grupos com perfis de MSP-PCR mais ou menos heterogéneos, e salvo exceções, como as das estirpes 5QSF18, 2PSM1, 3ArV4 e 5OSF12, a grande maioria das estirpes parece formar um grupo filogenético suportado estatisticamente e que inclui *Ery. hasegawianum* e *Sp. yunnanensis* (Figura 3.18), sendo muito difícil tomar uma decisão definitiva sobre o seu estatuto.

Os perfis de MSP-PCR permitiram a definição de diferentes grupos de estirpes (Figura 3.21): A1 (4 estirpes), A2 (3 estirpes), B (9 estirpes), C (1 estirpe), D (4 estirpes), E (2 estirpes), F (13 estirpes) e G (1 estirpe). As duas estirpes do grupo E apresentam micélio verdadeiro com ansas de anastomose incompletas. Foi observada a produção de balistoconídios na maioria das estirpes pertencentes ao grupo B e em 3CSF15, incluída no grupo F. Macromorfológicamente, todas as estirpes de *Ery. cf. hasegawianum* produzem colónias muito semelhantes, de textura pastosa e cor rosa. Existem algumas diferenças nos perfis de assimilação de fontes de carbono e de azoto entre alguns destes grupos (Apêndice III). Por exemplo, apenas os elementos dos grupos C, E e G conseguem utilizar D-glucosamina como fonte de carbono e os elementos do grupo E não conseguem assimilar D-glucuronato, ao contrário de todas as outras estirpes. Talvez o mais interessante seja a

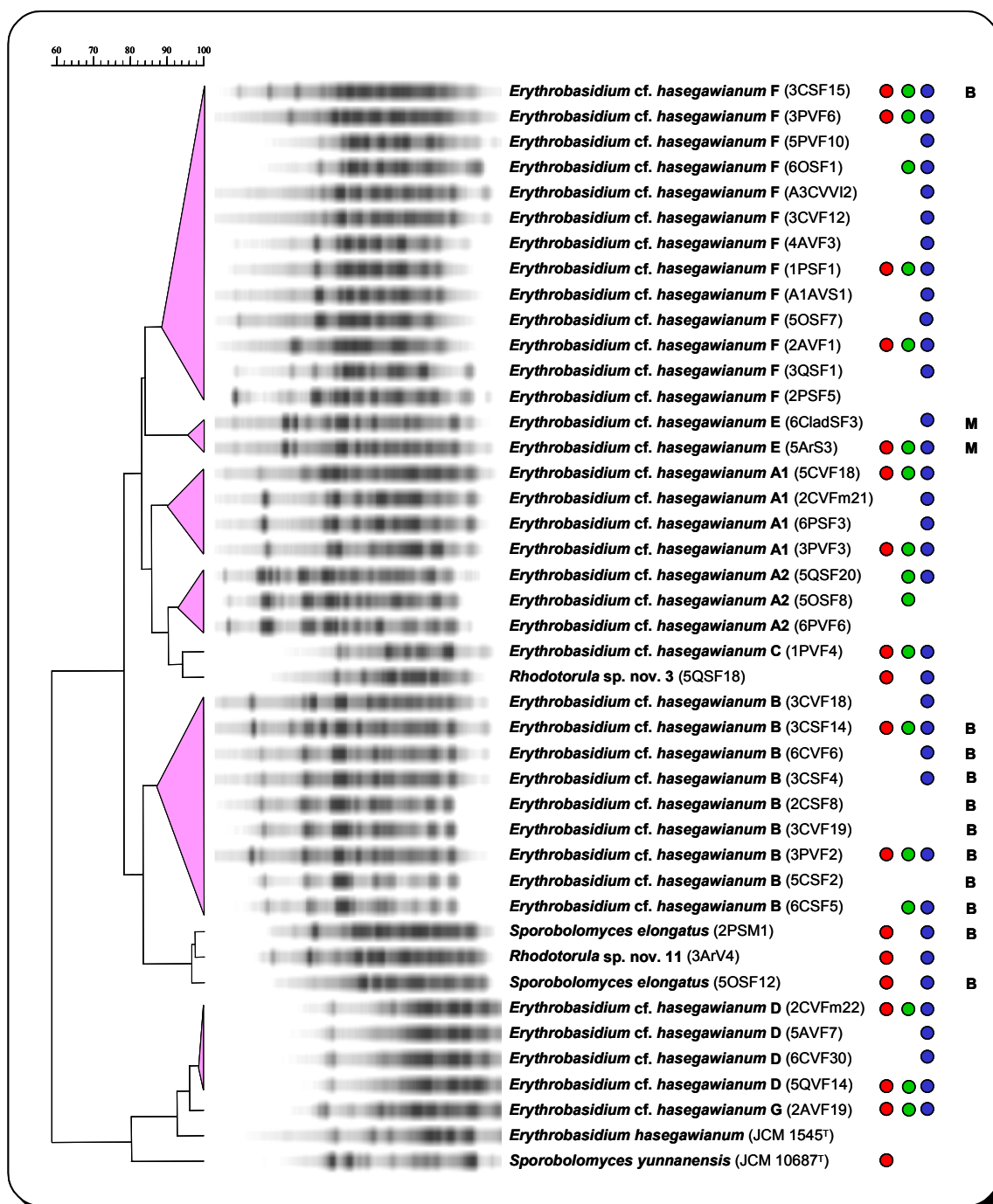


Figura 3.21. Dendrograma de isolados de leveduras da classe Urediniomicetas, linhagem *Erythrobasidium*, relacionadas com o grupo *Erythrobasidium hasegawianum*, construído com base na comparação de perfis de bandas de DNA obtidos por MSP-PCR com o *primer* M13 (Coeficiente de Pearson; programa informático GelCompar). T – Estirpe Tipo; ● – Estirpe seleccionada para sequenciação da região D1/D2; ● – Estirpe seleccionada para sequenciação da região ITS; ● – Estirpe para a qual foi realizada a identificação fenotípica completa; B – Produção de balistoconídios; M - Produção de micélio.

diferença na utilização de nitrato como fonte de azoto, positiva nos grupos A1, B, C, E e F, e negativa nos restantes.

A análise das sequências da região D1/D2 do rDNA 26S e ITS (Figuras 3.18 e 3.22) das estirpes filogeneticamente mais próximas de *Ery. hasegawianum* não foi suficiente para uma resolução ao nível de espécie neste grupo. Este parece, no entanto, bastante heterogéneo, quer em relação a algumas características morfológicas, como a produção de micélio (5ArS3 e 6CladSF3) e a produção de balistoconídios, quer em relação às características fisiológicas (Apêndice III). Mesmo as diferenças nas sequências das regiões D1/D2 e ITS entre as estirpes deste grupo não eram consistentes. Serão necessários mais testes, incluindo a determinação da percentagem de homologia DNA/DNA, para clarificar o estatuto taxonómico destas estirpes designadas provisoriamente por *Ery. cf. hasegawianum*.

As estirpes 2PSM1 e 5OSF12, que produzem balistoconídios e colónias de textura mucosa e de cor rosa, representam, possivelmente, a espécie *Sp. elongatus*, apresentando uma ou nenhuma substituição na região D1/D2 em relação à sequência nucleotídica desta espécie (Figura 3.18). Com base nesta mesma sequência, é provável que tanto a estirpe 5QSF18, que produz colónias de cor laranja garrido, e 3ArV4, com culturas de cor laranja pálido, representem espécies não descritas, *Rhodotorula* sp. nov. 3 e *Rhodotorula* sp. nov. 11, respectivamente, com diferenças significativas na região D1/D2 em relação às outras espécies da linhagem *Erythrobasidium* (Figura 3.18).

Grupo *Rhodotorula minuta*

Um outro grupo de leveduras que se verificou ser ubíquo no filoplano das plantas estudadas pertence igualmente à linhagem *Erythrobasidium*. Estas leveduras são caracterizadas pela formação de culturas de cor rosa translúcido, em meio MYP, com textura bastante mucosa. Foram caracterizadas 11 destas estirpes, semelhantes entre si, e outras filogeneticamente próximas que se supõe representarem novas espécies.

A análise do dendrograma apresentado na Figura 3.23 evidencia a formação de um grupo algo heterogéneo compreendendo as 11 estirpes referidas e que parece estarem filogeneticamente próximas de *Rh. cf. slooffiae* (Figura 3.18). Observa-se ainda a formação de um grupo que inclui dois perfis de MSP-PCR semelhantes e correspondentes a uma espécie não reconhecida, *Rhodotorula* sp. nov. 2, filogeneticamente próxima de *Occultifur externus* (Figura 3.18), e a presença de um perfil único correspondente a outra espécie, *Rhodotorula* sp. nov. 1 (Figura 3.18). De referir que o perfil obtido para a estirpe tipo de

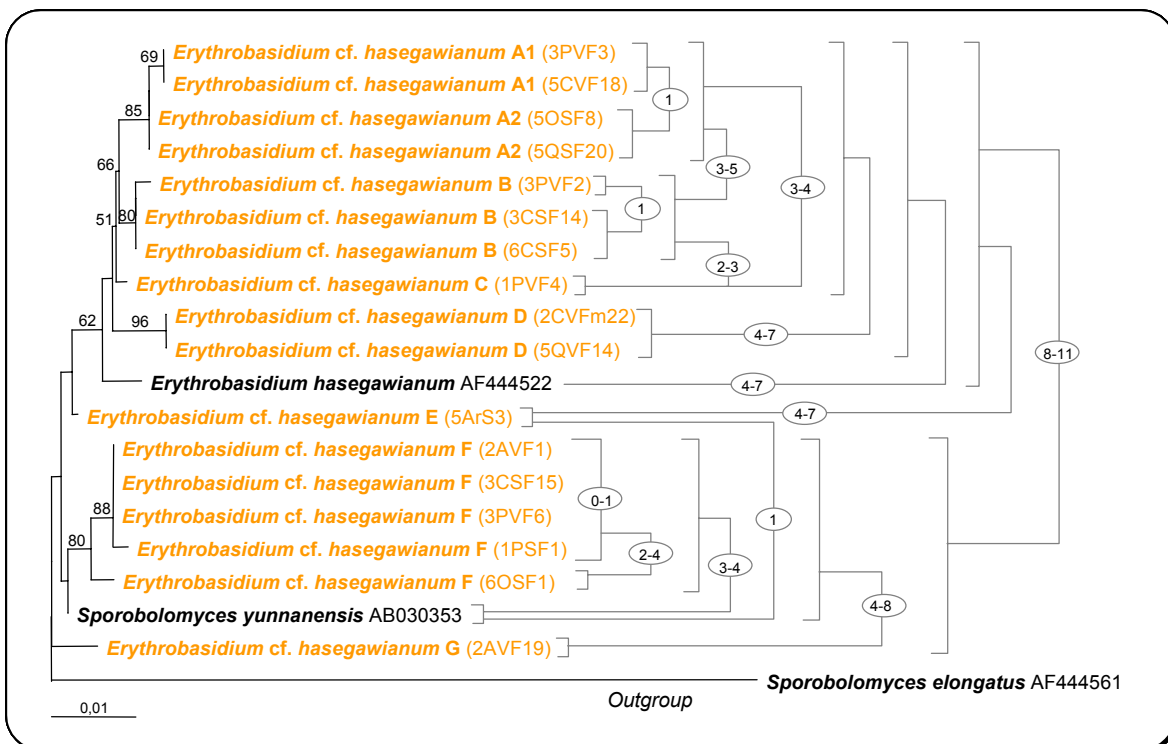


Figura 3.22. Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA de leveduras relacionadas com *Erythrobasidium hasegawianum*, linhagem *Erythrobasidium*, classe Urediniomycetes, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente. As sequências determinadas neste estudo estão realçadas a laranja. Nalguns casos é indicado o número de bases diferentes entre as sequências de algumas estirpes.

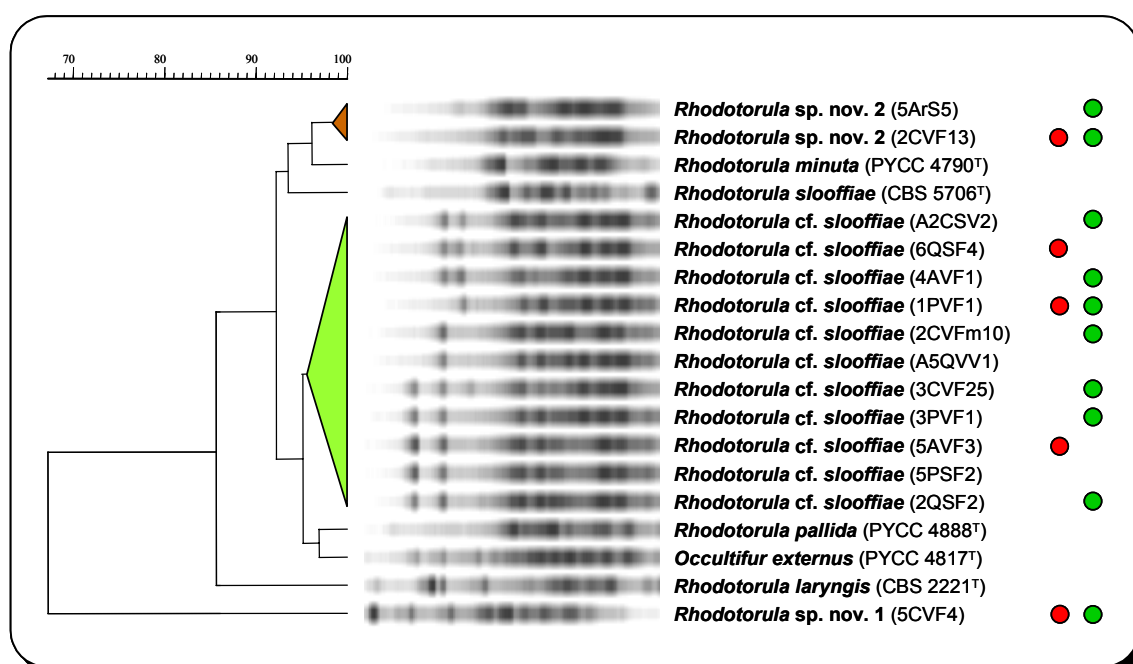


Figura 3.23. Dendrograma de isolados de leveduras da classe Urediniomycetas, linhagem Erythrobasidium, relacionadas com o grupo *Rhodotorula minuta*, construído com base na comparação de perfis de bandas de DNA obtidos por MSP-PCR com o *primer* M13 (Coeficiente de Pearson; programa informático GelCompar). **T** – Estirpe Tipo; ● – Estirpe seleccionada para sequenciação da região D1/D2; ● – Estirpe para a qual foi realizada a identificação fenotípica completa.

Rh. slooffiae não se assemelha aos apresentados pelos representantes de *Rh. cf. slooffiae* (Figura 3.23).

As três estirpes de *Rh. cf. slooffiae* para as quais se determinou a sequência da região D1/D2 do rDNA 26S apresentam algumas diferenças nesta região (Figura 3.18). Estas diferenças, em conjunto com as apresentadas nos perfis de MSP-PCR, sugerem estarmos na presença de um novo grupo complexo. Podemos ter uma ideia da heterogeneidade das estirpes identificadas como *Rh. slooffiae* pela árvore filogenética apresentada na Figura 3.24, na qual se incluem, além das sequências determinadas neste trabalho, algumas outras disponíveis em bases de dados públicas referentes a esta espécie. Tal como no caso das estirpes relacionadas com *Ery. hasegawianum*, as sequências da região D1/D2 apresentam um máximo de duas diferenças entre si, sendo necessário mais estudos sobre a sistemática deste grupo.

Linhagem Sporidiobolus

Foram isoladas a partir do filoplano poucas leveduras (13) pertencentes à linhagem *Sporidiobolus* através do método de plaqueamento da lavagem das folhas (ver Cap. II). No entanto, utilizando o método de recolha dos balistoconídios (SFM), foram isoladas cerca de 70 leveduras, a grande maioria evidenciando produção destas estruturas e designadas preliminarmente por *Sp. roseus*. Este grupo de leveduras era, no entanto, bastante heterogéneo, e algumas das estirpes isoladas foram seleccionadas para avaliar a sua posição taxonómica (Tabela 3.8).

Na Figura 3.25 apresenta-se um dendrograma baseado na comparação de perfis de bandas de DNA obtidas por MSP-PCR com o *primer* (GTG)₅ para estirpes de leveduras da linhagem *Sporidiobolus*, produtoras de balistoconídios. A análise dos perfis de MSP-PCR revela a formação de quatro grupos de leveduras produtoras de balistoconídios. Um destes grupos, com cinco estirpes, corresponde a uma espécie recentemente descrita, *Sp. odoratus* (Valério *et al.* 2002) (Figura 3.26). Estas estirpes produzem colónias com uma cor rosa claro, com um odor muito característico. Um outro grupo, composto por nove estirpes (Figura 3.25), corresponde a *Sp. ruberrimus* (Figura 3.26). Formaram-se ainda dois grupos filogeneticamente próximos de *Sp. roseus* (Figura 3.26), designados por *Sp. cf. roseus* A e B, apresentando a estirpe tipo de *Sp. roseus* um perfil com algumas semelhanças com os perfis apresentados pelos elementos de *Sp. cf. roseus* B (Figura 3.25).

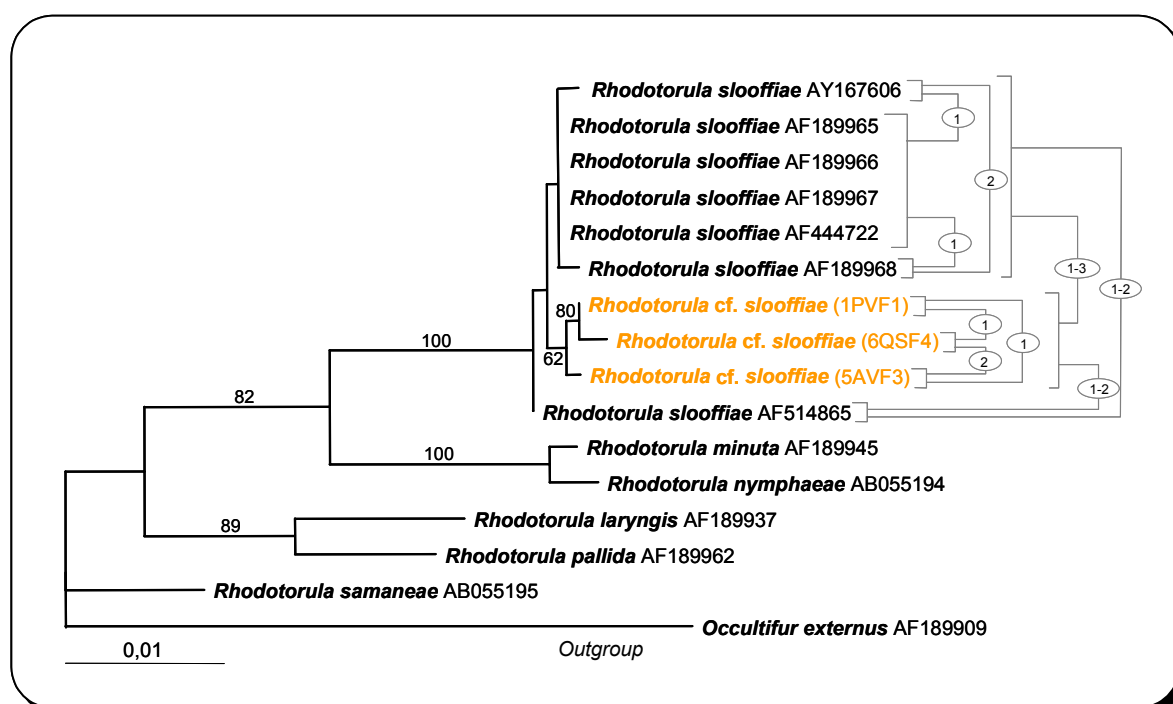


Figura 3.24. Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de leveduras relacionadas com *Rhodotorula slooffiae*, obtida pelo método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente. As sequências determinadas neste estudo estão realçadas a laranja. Nalguns casos é indicado o número de bases diferentes entre as sequências de algumas estirpes.

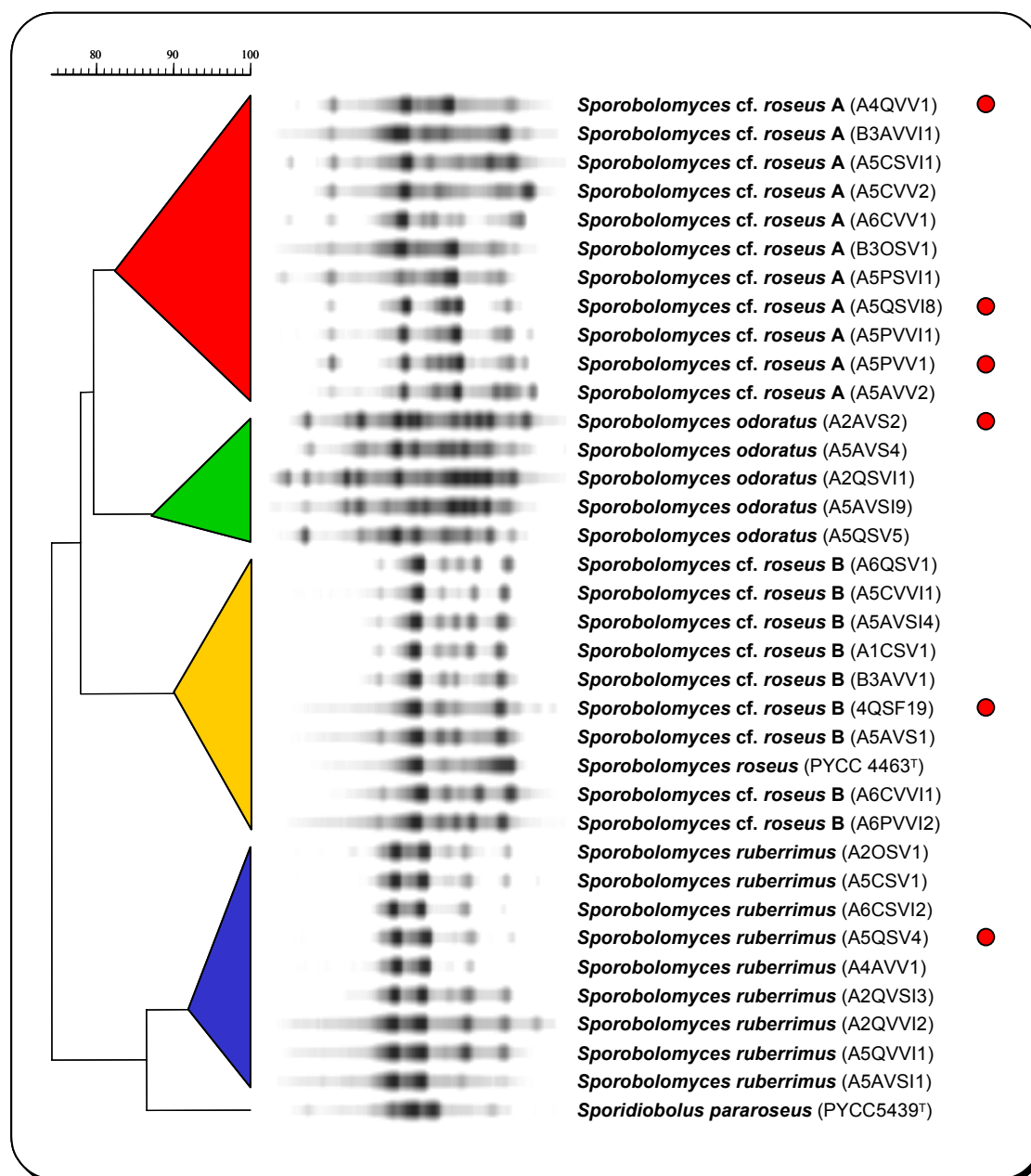


Figura 3.25. Dendrograma de isolados de leveduras da classe Urediniomycetes, linhagem Sporidiobolus, relacionadas com *Sporobolomyces roseus*, construído com base na comparação de perfis de bandas de DNA obtidas por MSP-PCR com o *primer* (GTG)₅ (Coeficiente de Pearson; programa informático GelCompar). T – Estirpe Tipo; ● – Estirpe seleccionada para sequenciação da região D1/D2.

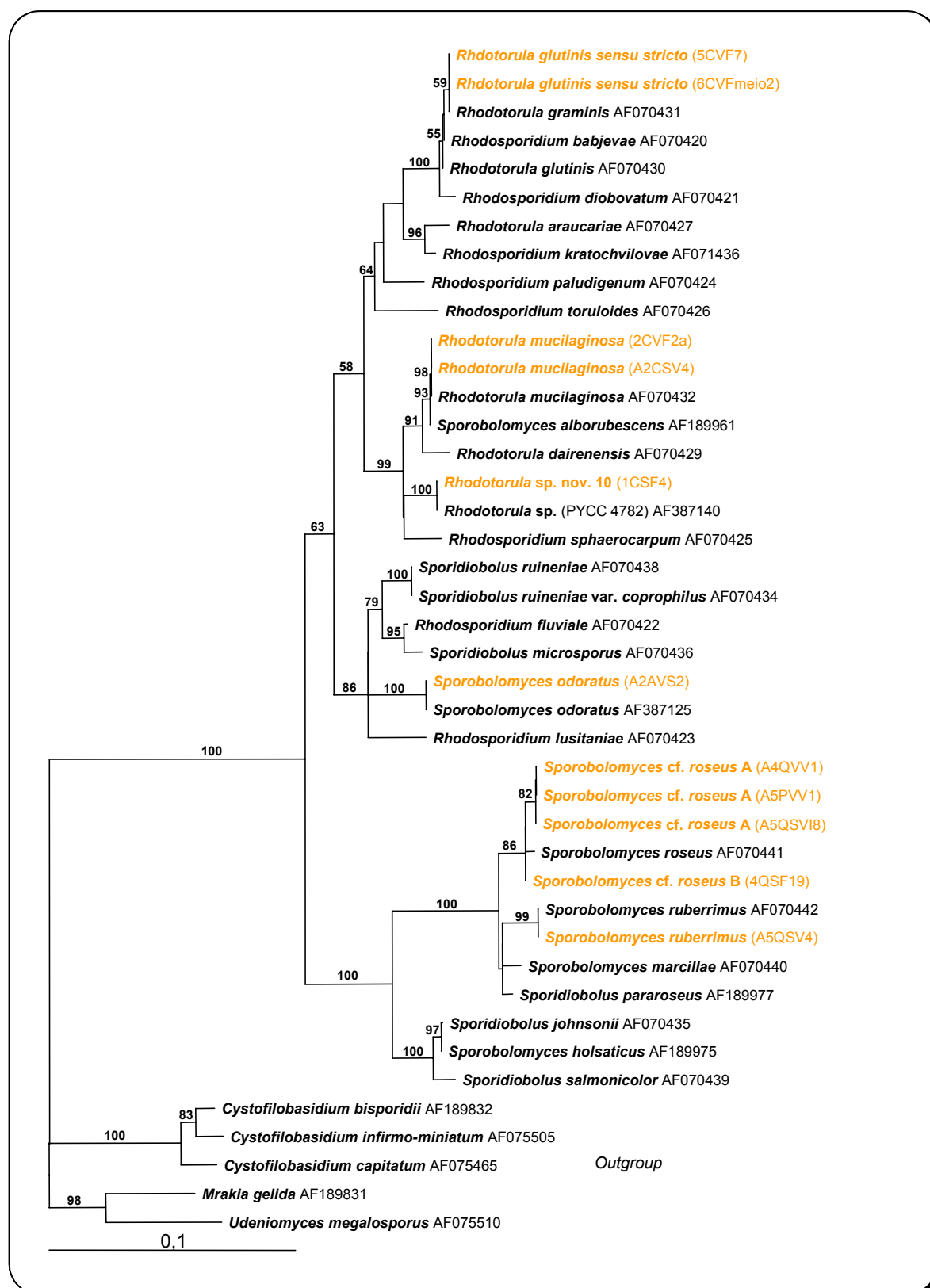


Figura 3.26. Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de membros da linhagem Sporidiobolus, classe Urediniomycetes, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente. As sequências determinadas neste estudo estão realçadas a laranja.

Tabela 3.8. Leveduras caracterizadas da linhagem *Sporidiobolus*, classe Urediniomycetes, e respectiva origem

Espécie	Estirpe	Origem
<i>Rhodotorula</i> sp. nov. 10	1CSF4	Folha de <i>Cistus albidus</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Rh. glutinis sensu stricto</i>	5CVF7	Folha de <i>Cistus albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	6CVFmeio2	<i>Idem</i>
<i>Rh. mucilaginosa</i>	2CVF2a	<i>Idem</i>
	A2CSV4	<i>Idem</i>
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	PYCC 5439 ^T	Solo, Japão
<i>Sporobolomyces odoratus</i>	A2AVS2	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	A2QSVI1	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	A5AVS4	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	A5AVSI9	<i>Idem</i>
	A5QSV5	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Sp. roseus</i>	PYCC 4463 ^T	-
<i>Sp. cf. roseus</i> A	A4QVV1	Folha de <i>Quercus faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	A5AVV2	Folha de <i>Acer monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	A5CSV11	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	A5CVV2	<i>Idem</i>
	A5PSVI1	Folha de <i>Pistacia lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)
	A5PVI1	<i>Idem</i>
	A5PVI1	<i>Idem</i>
	A5QSVI8	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	A6CVV1	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	B3AVV1	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	B3OSV1	Folha de <i>Osyris quadripartita</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Sp. cf. roseus</i> B	4QSF19	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	A1CSV1	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	A5AVS1	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	A5AVSI4	<i>Idem</i>
	A5CVV11	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	A6CVV11	<i>Idem</i>
	A6PVI1	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)
	A6QSV1	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	B3AVV1	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Sp. ruberrimus</i>	A2QSV1	Folha de <i>O. quadripartita</i> (Arrábida, Portugal)
	A2QVSI3	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	A2QVVI2	<i>Idem</i>
	A4AVV1	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	A5AVSI1	<i>Idem</i>
	A5CSV1	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	A5QSV4	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	A5QVVI1	<i>Idem</i>
	A6CSV12	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)

Numa publicação recente sobre leveduras relacionadas com *Sp. roseus* (Bai *et al.* 2002b) é apresentada uma árvore filogenética com elementos da linhagem *Sporidiobolus*, em que se inclui uma sequência de uma levedura com o número de acesso do GenBank AY070018. Esta sequência apresenta pelo menos cinco substituições nucleotídicas em relação à estirpe tipo de *Sp. roseus*, uma diferença em relação a *Sp. cf. roseus* A e pelo menos uma diferença em relação a *Sp. cf. roseus* B. Assim *Sp. roseus* parece ser também uma espécie relativamente heterogénea.

Para as estirpes em que não foi observada a produção de balistoconídios apenas foi obtida a sequência da região D1/D2 e determinado o perfil de assimilação de fontes de carbono e azoto (Apêndice III). Verificou-se que duas estirpes, 2CVF2a e A2CSV4, representam a espécie *Rh. mucilaginosa* (Figura 3.26) e que outras duas, 5CVF7 e 6CVFmeio2, pertencem a um grupo denominado *Rh. glutinis sensu stricto* (Gadanhó e Sampaio 2002), com

sequências da região D1/D2 do rDNA 26S idênticas à da estirpe tipo de *Rh. graminis* (Figura 3.26). A estirpe 1CSF4, com a sequência da região D1/D2 igual à de PYCC 4782, pertence a uma espécie não reconhecida e aqui designada como *Rhodotorula* sp. nov. 10 (Figura 3.26).

Linhagens Agaricostilbum e Microbotryum

Foram isoladas do filoplano das plantas estudadas cerca de uma dezena de leveduras pertencentes às linhagens Agaricostilbum e Microbotryum, da classe dos fungos Urediniomicetas. Na Tabela 3.9 estão listadas as estirpes caracterizadas pertencentes a estes grupos.

Tabela 3.9. Leveduras caracterizadas das linhagens Agaricostilbum e Microbotryum, classe Urediniomicetas, e respectiva origem

Espécie	Estirpe	Origem
<i>Kurtzmanomyces</i> sp. nov.	2AVF28	Folha de <i>Acer monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Rhodotorula</i> sp. nov. 5	2MV2	Medronho, Fonte do Veado (Arrábida, Portugal)
	3CSF17	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Rhodotorula</i> sp. nov. 6	2CVF22	<i>Idem</i>
<i>Rhodotorula</i> sp. nov. 7	2QVF9	Folha de <i>Quercus faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	4QVF22	<i>Idem</i>
	6QVFmeio2	<i>Idem</i>
<i>Rhodotorula</i> sp. nov. 8	A5AVV13	Folha de <i>Acer monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Rh. vanillica</i>	3CVF10	Folha de <i>Cistus albidus</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Sporobolomyces sasicola</i>	A2AVV7	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)

Estas leveduras foram caracterizadas fisiologicamente (Apêndice III) e obtidas as respectivas sequências da região D1/D2 do rDNA 26S. A árvore filogenética correspondente, com outros elementos destas linhagens, encontra-se na Figura 3.27. As estirpes 2MV2 e 3CSF17, que produzem colónias com textura pastosa e cor branca, parecem representar uma nova espécie designada por *Rhodotorula* sp. nov. 5, filogeneticamente próxima de *Rh. yarrowii*. Observa-se ainda que 2CVF22 representa, provavelmente, uma nova espécie designada *Rhodotorula* sp. nov. 6. Três estirpes que produzem colónias com textura muito pastosa e de cor branca, parecem representar uma nova espécie designada por *Rhodotorula* sp. nov. 7, afastada filogeneticamente de todas as outras pertencentes a esta linhagem. Curiosamente, estas três últimas estirpes foram isoladas a partir de amostragens realizadas em três anos consecutivos do filoplano de *Q. faginea*. Finalmente, a estirpe 3CVF10 produz colónias com textura mucosa e cor creme e presume-se que pertença à espécie *Rh. vanillica*.

Foram determinadas as sequências da região D1/D2 de duas estirpes pertencentes a espécies não reconhecidas da linhagem Agaricostilbum. A estirpe 2AVF28, que forma colónias de cor laranja claro e com textura pastosa, e cujas células produzem conídeos em

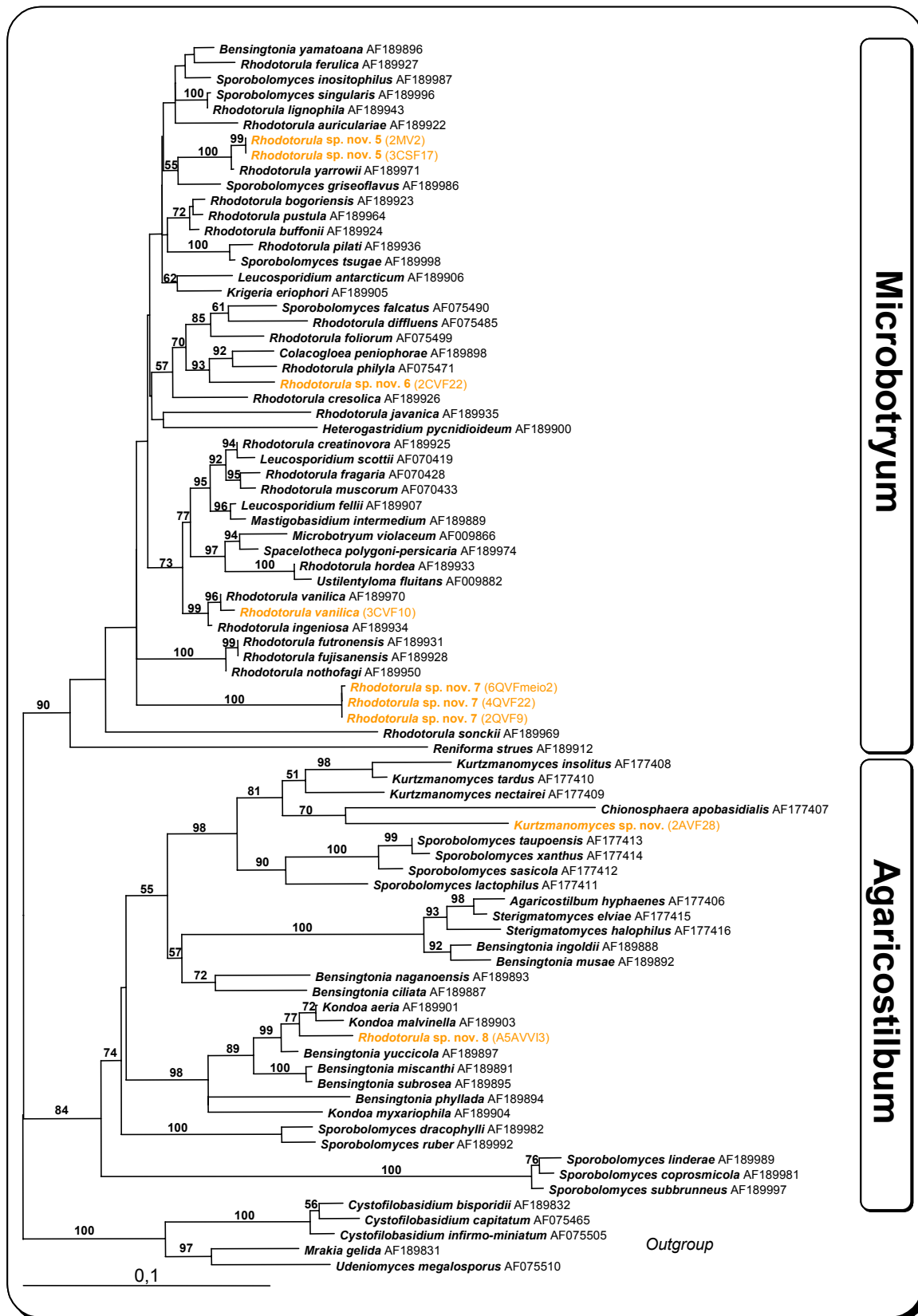


Figura 3.27. Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de membros das linhagens Microbotryum e Agaricostilbum, classe Urediniomycetes, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do GenBank para a sequência correspondente. As sequências determinadas neste estudo estão realçadas a laranja.

pedúnculos, foi identificada como *Kurtzmanomyces* sp. nov. (Figura 3.27). A estirpe A5AVV13 foi denominada *Rhodotorula* sp. nov. 8, formando colónias de cor branca e textura pastosa. A sua inclusão no género *Rhodotorula* é provisória, não se tendo incluído esta estirpe num dos géneros filogeneticamente mais próximos: *Kondoa*, porque não se observaram estruturas sexuadas (ver Introdução deste capítulo); ou *Bensingtonia*, porque não foi detectada a produção de balistoconídios. A estirpe A2AVV7 foi identificada como *Sp. sasicola* com base apenas nos resultados dos testes fisiológicos, apresentando um perfil de assimilação de fontes de carbono e azoto similar a uma outra estirpe pertencente a esta espécie (Apêndice III).

III.3.3. Taxonomia de isolados da classe Ustilaginomicetas

Foram isoladas cerca de 150 estirpes de leveduras do filoplano das plantas amostradas que foram integradas na classe Ustilaginomicetas, maioritariamente representantes de *Tilletiopsis* spp. e de *Rh. bacarum* (ver Cap. II). Não foi realizado um trabalho de caracterização intensivo destas estirpes. Apresenta-se apenas os resultados da caracterização de algumas das leveduras isoladas (Tabela 3.10), incluindo os testes de identificação convencionais (Apêndice III).

Tabela 3.10. Leveduras da classe Urediniomicetas caracterizadas e respectiva origem de isolamento

Espécie	Estirpe	Origem
<i>Exobasidium</i> sp. 1	2AVF29	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Exobasidium</i> sp. 2	3CVF37	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Microstroma</i> sp.	6QSF8	Folha de <i>Quercus faginea</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Pseudozyma fusiformata</i>	2CSFm4	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	2CVF7	<i>Idem</i>
	3CVF23	<i>Idem</i>
	3CVF3	<i>Idem</i>
	3CVF4	<i>Idem</i>
	A2CVV6	<i>Idem</i>
	A4QSVI5	Folha de <i>Quercus faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	PYCC 4833 ^T	<i>Brassica oleacea</i> var. <i>botrytis</i> (Reino Unido)
<i>Rhodotorula</i> sp. nov. 9	3CVF35	Folha de <i>Cistus albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	5CSFe9	<i>Idem</i>
<i>Rh. acheniorum</i>	3CVF20	<i>Idem</i>
	3CVF5	<i>Idem</i>
	5CVFe5	<i>Idem</i>
	5MV2	Medronho, Fonte do Veado (Arrábida, Portugal)
	PYCC 4847 ^T	Morango (Inglaterra)
<i>Rh. bacarum</i>	PYCC 4391 ^T	<i>Ribes nigrum</i> cultivar
	1CSF8*	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	1QVL4*	Inflorescências de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	2AVF32*	Folhas de <i>Acer monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	3ArV1*	Ar, Fonte do Veado (Arrábida, Portugal)
	4AVF11*	Folhas de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	4QSF3*	Folhas de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	4QVF18	<i>Idem</i>
	6OSF4	Folha de <i>Osyris quadripartita</i> (Arrábida, Portugal)
	B3QSV5*	Folhas de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Tilletiopsis</i> spp.	A1CVV2*	Folha de <i>Cistus albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	A3CVV14*	<i>Idem</i>

*Estirpes para as quais se realizaram apenas os testes de identificação convencionais.

Na Figura 3.28 apresenta-se uma árvore filogenética com elementos deste grupo de leveduras, na qual se incluem as sequências obtidas neste trabalho. Duas das estirpes caracterizadas produzem culturas bastante pastosas, de cor branca (no caso de 2AVF29) ou amarelada (3CVF37). Estas leveduras não foram identificadas ao nível da espécie, mas verificou-se estarem filogeneticamente próximas de membros do género fitoparasita dimórfico *Exobasidium*. Outra levedura que não foi identificada ao nível da espécie foi 6QSF8, que apresenta apenas uma substituição nucleotídica na região D1/D2 em relação à sequência do fungo dimórfico fitopatogénico *Microstroma juglandis*, tendo sido designada por *Microstroma* sp. (Figura 3.28). As estirpes 4QVF18 e 6OSF4 foram identificadas como *Rh. bacarum* (Figura 3.28) e apresentam uma macromorfologia muito peculiar: formam culturas com textura pastosa a tender para cremosa, viscosas e de uma cor rosada em meio MYP.

Um caso interessante é constituído pelo conjunto de estirpes identificadas como *Ps. fusiformata*, isoladas maioritariamente a partir do filoplano de *Ci. albidus*. Estas estirpes apresentam perfis de MSP-PCR com o *primer* M13 homogéneos entre si (Figura 3.29A), incluindo o da estirpe tipo desta espécie (PYCC 4833^T), e têm sequências da região D1/D2 que diferem apenas numa substituição nucleotídica em relação à mesma estirpe (Figura 3.28). Uma característica particular deste grupo de estirpes é a produção de um pigmento avermelhado para o meio de cultura quando mantidas em meio PDA a 4 °C. De notar, no entanto, que a estirpe tipo de *Ps. fusiformata* não produz este pigmento.

Outro caso interessante é constituído por um grupo de estirpes também isoladas do filoplano de *Ci. albidus*, com a excepção de 5MV2 que foi isolada de medronhos, e que se verificou estarem filogeneticamente próximas de *Rh. acheniorum* (Figura 3.28). Apresentam uma macromorfologia muito semelhante, com uma textura pastosa e cor castanho claro. Pela análise dos seus perfis de MSP-PCR obtidos com o *primer* M13 (Figura 3.29B), ressalta a formação de um grupo, que também inclui a estirpe tipo de *Rh. acheniorum*, e de um conjunto de duas estirpes com perfis bastante diferentes dos primeiros. A análise das sequências da região D1/D2 do rDNA 26S conduziu à identificação do primeiro grupo de perfis como pertencente a *Rh. acheniorum*, uma vez que apresentavam sequências idênticas à da estirpe tipo desta espécie, aparte algumas deleções/inserções (Figura 3.28). As outras duas estirpes, 3CVF35 e 5CSFe9, parecem representar uma espécie distinta designada por *Rhodotorula* sp. nov. 9 (Figura 3.28). Fisiologicamente, estas duas espécies diferem bastante, nomeadamente na assimilação de L-sorbose, D-glucosamina, metilglucósido, melibiose, lactose, amido solúvel, xilitol, *myo*-inositol e glucono-lactona, e na capacidade de crescimento em meio sem vitaminas (Apêndice III).

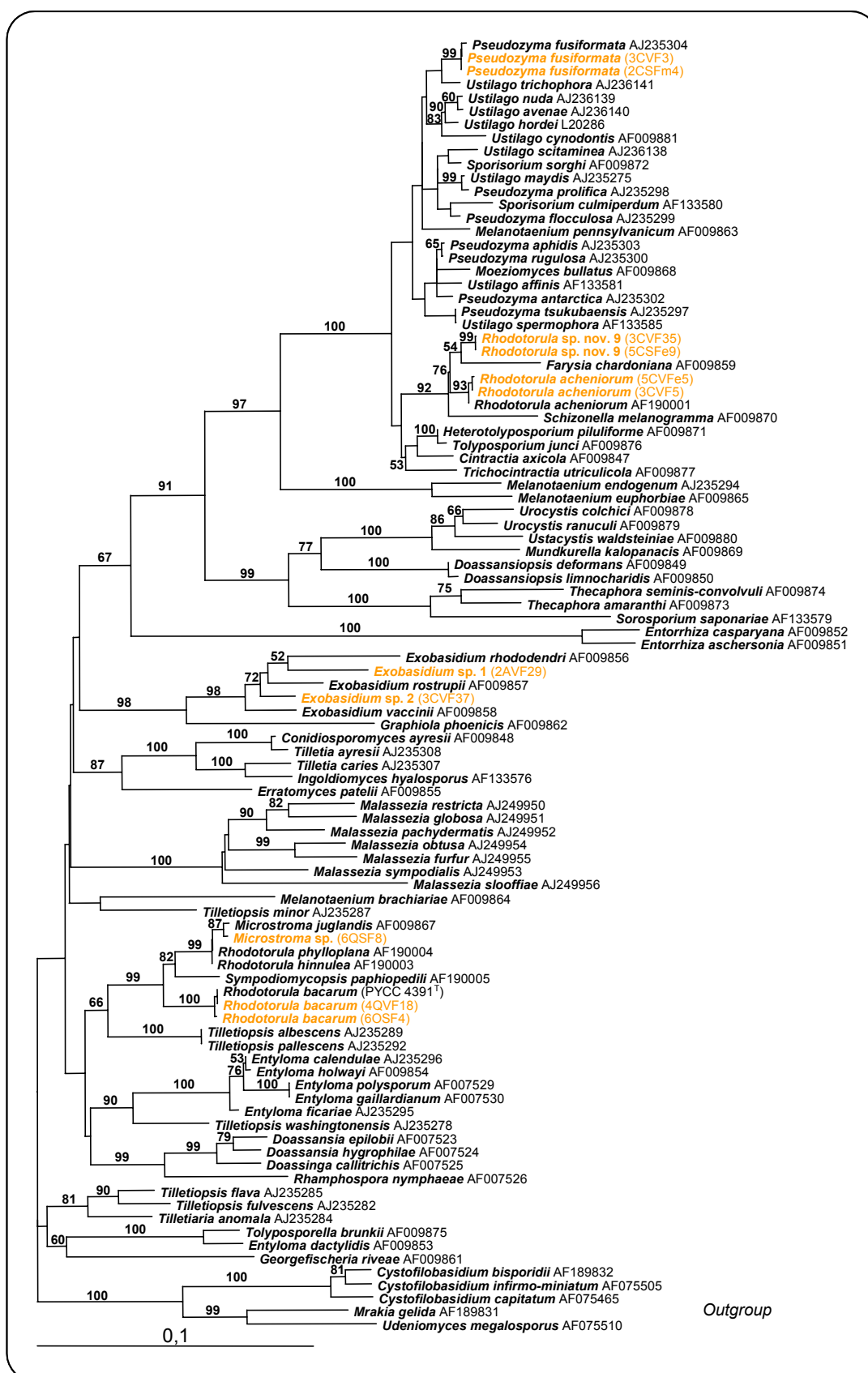


Figura 3.28. Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1/D2 do gene do rRNA 26S de membros dos Ustilaginomicetas, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente. As sequências determinadas neste estudo estão realçadas a laranja.

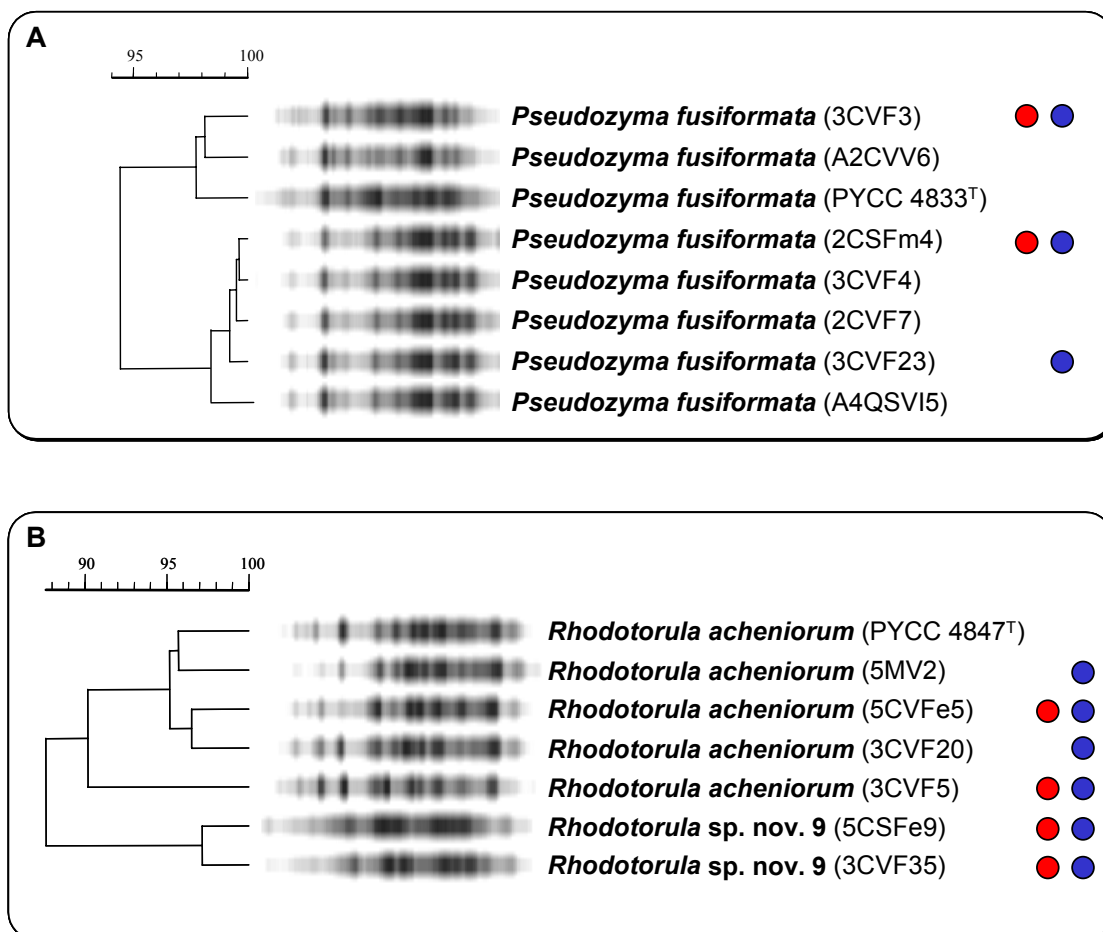


Figura 3.29. Dendrogramas de isolados de leveduras da classe Ustilaginomicetas, construído com base na comparação de perfis de bandas de DNA obtidas por MSP-PCR com o *primer* M13 (Coeficiente de Pearson; programa informático GelCompar): **A** – Estirpes relacionadas com *Pseudozyma fusiformata*, e **B** – Estirpes relacionadas com *Rhodotorula acheniorum*. **T** – Estirpe Tipo; ● – Estirpe seleccionada para sequenciação da região D1/D2; ● – Estirpe para a qual foi realizada a identificação fenotípica completa.

As duas estirpes A1CVV2 e A3CVVI4 foram identificadas como *Tilletiopsis* sp., pois apresentam uma macromorfologia comum neste grupo de fungos dimórficos, produzindo os característicos balistoconídios em forma de banana (Kurtzman e Fell 1998).

III.3.4. Taxonomia de isolados do grupo dos fungos Arquiascomicetas

Estados leveduriformes de Taphrina spp.

Foram isoladas cerca de 70 estirpes de levedura que apresentavam uma combinação muito peculiar de características avaliadas nos testes preliminares: produção de urease e de compostos amiláceos extracelulares e reacção negativa com o corante de azul diazónio B. Foi, assim, sugerida uma possível relação destas estirpes com membros do género fitoparasita dimórfico *Taphrina*, que apresentam no seu ciclo de vida uma fase leveduriforme resultante da germinação dos ascósporos e em que as células não se distinguem das chamadas leveduras convencionais (Kramer 1987). O género dimórfico *Taphrina* compreende cerca de 100 espécies, que têm sido essencialmente diferenciadas com base no hospedeiro, tipo e local da infecção, e morfologia da fase sexuada (Mix 1949). Moore (1998) propôs o género *Lalaria* para as fases leveduriformes anamórficas do género *Taphrina*. Muito recentemente, foi publicado um estudo sobre este género utilizando metodologias moleculares (Rodrigues e Fonseca 2003). É muito raro o isolamento da fase leveduriforme de *Taphrina* a partir de tecidos não infectados (Kramer 1987, Moore 1998). De realçar que os isolamentos no decorrer deste trabalho foram sempre realizados a partir de folhas com aspecto aparentemente são.

Foram caracterizadas 48 estirpes deste grupo de leveduras, incluindo seis estirpes de referência obtidas de colecções de culturas (Tabela 3.11). Os dados obtidos foram comparados com os descritos por Rodrigues e Fonseca (2003), que incluíram a maior parte das estirpes de *Taphrina* disponíveis em colecções de culturas. Um dendrograma resultante da análise de perfis de bandas de DNA obtidas por MSP-PCR com o *primer* (GAC)₅ é apresentado na Figura 3.30. Foram obtidas as sequências das regiões D1/D2 do rDNA 26S e ITS para algumas estirpes seleccionadas, e as árvores filogenéticas resultantes da sua análise são apresentadas nas Figuras 3.31 e 3.32, respectivamente.

No dendrograma apresentado na Figura 3.30 observa-se que a maior parte dos perfis de MSP-PCR são bastante homogéneos entre si e correspondem a uma nova espécie designada por *L. inositophila* sp. nov.. A maioria destas estirpes distribui-se por dois sub-grupos (C e D), cujos perfis são semelhantes, mas com bandas menos intensas no grupo C,

Tabela 3.11. Leveduras caracterizadas do grupo dos fungos Arquiascomicetas, e respectiva origem de isolamento

Espécie	Estirpe	Origem
<i>Lalaria arrabidae</i> sp. nov.	2PSF2	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)
<i>L. inositophila</i> sp. nov.	2AVF23	Folha de <i>Acer monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	2AVF6	<i>Idem</i>
	2CVF17	Folha de <i>Cistus albidus</i> (Arrábida, Portugal)
<i>L. inositophila</i> sp. nov.	2PVF10	Folha de <i>Pistacia lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)
	2PVF12	<i>Idem</i>
	3PVF5	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	3CSF12	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	3CVF11	<i>Idem</i>
	3CVF26	<i>Idem</i>
	3QVL3	Flor de <i>Quercus faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	4QVF17	<i>Idem</i>
	4QVF27	<i>Idem</i>
	4QVF49	<i>Idem</i>
	5AVF10	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	5AVFs15	<i>Idem</i>
	5CVF3	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	5CSFe11	<i>Idem</i>
	5CVFe7	<i>Idem</i>
	5PSF11	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)
	5PVF20	<i>Idem</i>
	5QSF7	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	5QVF16	<i>Idem</i>
	5QVF5	<i>Idem</i>
	6CSF4	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	6CVF7	<i>Idem</i>
	6PVF11	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)
	6PVF28	<i>Idem</i>
	6PVF30br	<i>Idem</i>
	A2AVV5	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	A2CSV1	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	A2CVV4	<i>Idem</i>
	A2QVSI2b	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
	A3CSV1	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
	A3CSV4	<i>Idem</i>
	A3CVV11	<i>Idem</i>
	A5QSVI3a	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
<i>L. kurtzmanii</i> sp. nov.	5CVFe25	Folha de <i>Ci. albidus</i> (Arrábida, Portugal)
<i>L. veronirambellii</i> sp. nov.	6AVF2	Folha de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	6AVL4	Flor de <i>Ac. monspessulanum</i> (Arrábida, Portugal)
	6PVF29	Folha de <i>Pi. lentiscus</i> (Arrábida, Portugal)
	6QVF8	Folha de <i>Q. faginea</i> (Arrábida, Portugal)
<i>Taphrina carpini</i>	CBS 102169	<i>Carpinus betulus</i> (Eslováquia)
<i>Tap. nana</i>	CBS 336.55	<i>Betula nana</i> (Suécia)
<i>Tap. polystichi</i>	CBS 379.39	-
<i>Tap. tormentillae</i>	CBS 339.55	<i>Potentilla canadensis</i> (U.S.A.)
<i>Tap. virginica</i>	CBS 340.55	<i>Ostrya virginiana</i> (U.S.A.)
<i>Tap. wiesneri</i>	CBS 275.28	<i>Prunus avium</i> (?)

o que poderá ter contribuído para uma separação artificial destes dois grupos, uma vez que o coeficiente de Pearson utilizado para a construção do dendrograma tem em conta a intensidade de cada banda para o cálculo das semelhanças. Com perfis ligeiramente diferentes, encontramos o grupo A, que inclui as estirpes 3CVF26 e 5CVFe7, e o grupo B, contendo apenas a estirpe 4QVF27. No entanto, visualmente, todos estes perfis se assemelham entre si. De referir que todas estas estirpes foram isoladas do filopiano das plantas estudadas, com a exceção de 3QVL3, isolada de inflorescências de *Q. faginea*. Com algumas bandas em comum em relação aos grupos anteriores, mas apresentando perfis diferentes, encontramos as estirpes representantes de *Taphrina virginica* (CBS 340.55) e *Tap. polystichi* (CBS 379.39). Observa-se ainda a formação de um outro grupo contendo quatro estirpes com perfis bastante homogêneos, designado por *L. veronirambellii*

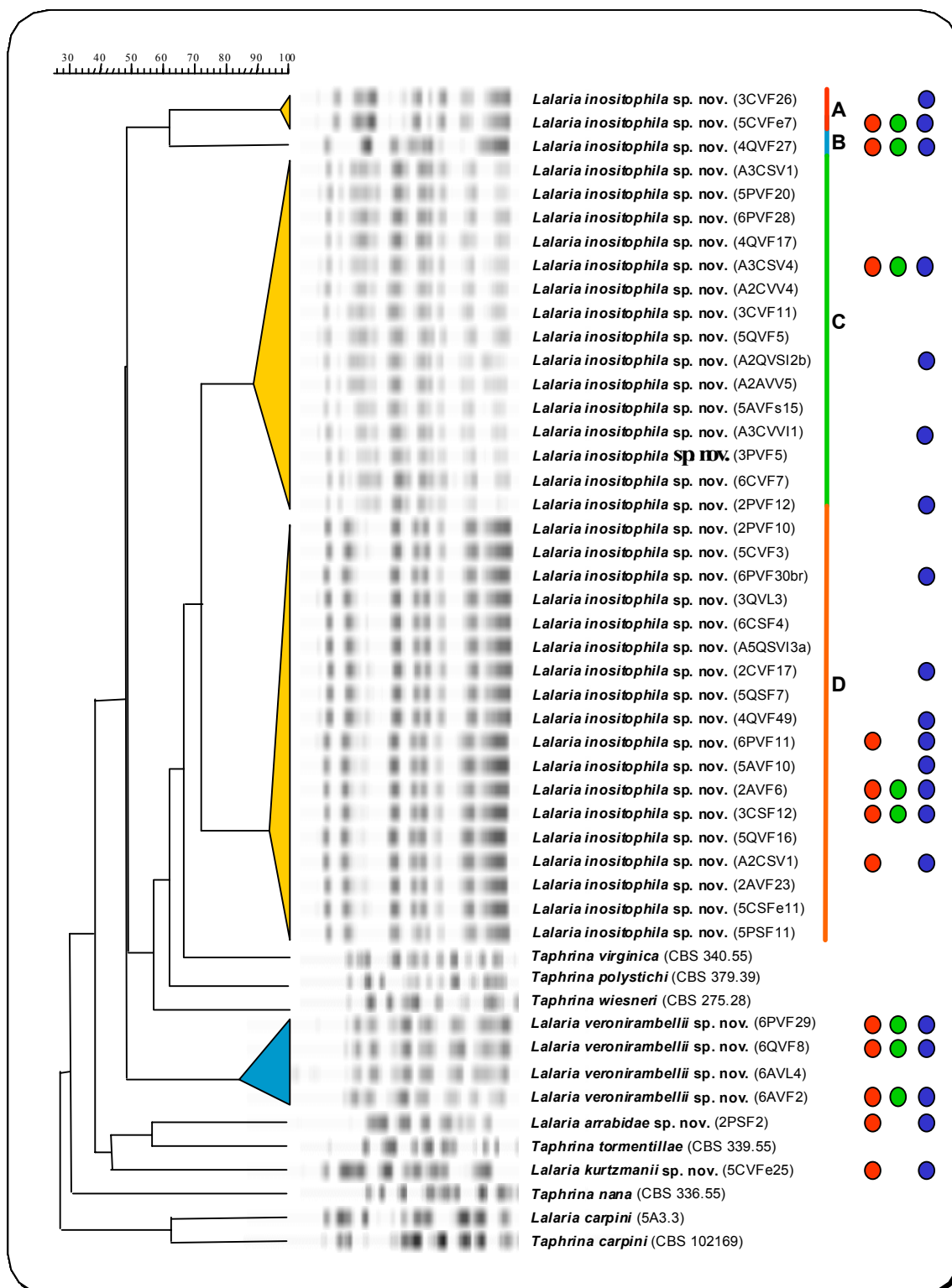


Figura 3.30. Dendrograma de isolados de leveduras do grupo dos Arquiascomicetas, construído com base na comparação de perfis de bandas de DNA obtidas por MSP-PCR com o *primer* (GAC)₅ (Coeficiente de Pearson; programa informático GelCompar). T – Estirpe Tipo; ● – Estirpe seleccionada para sequenciação da região D1/D2; ● – Estirpe seleccionada para sequenciação da região ITS; ● – Estirpe para a qual foi realizada a identificação fenotípica completa.

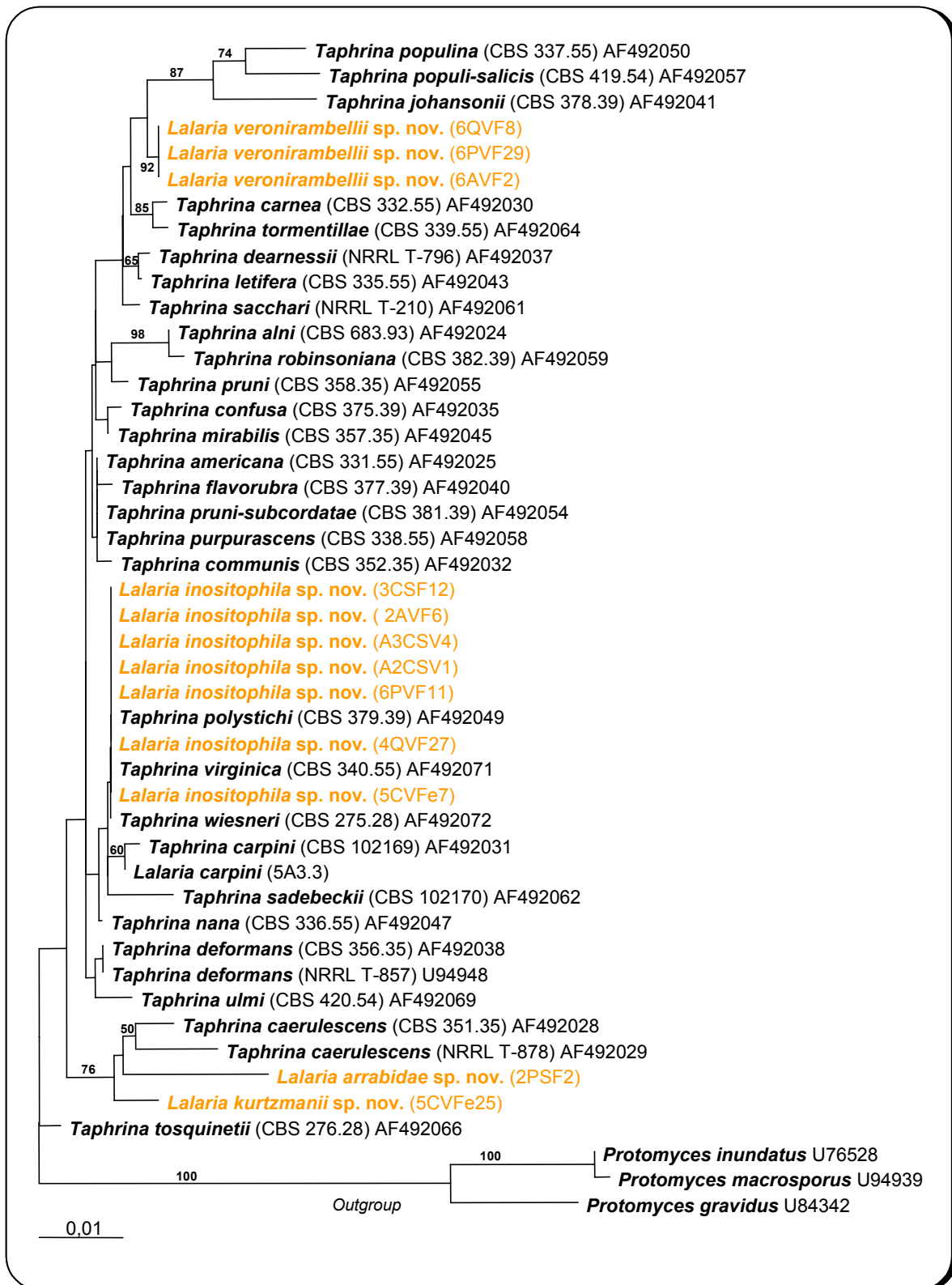


Figura 3.31. Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região D1D2 do gene do rRNA 26S de membros dos Arquiascomycetes, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente. As sequências determinadas neste estudo estão realçadas a laranja.

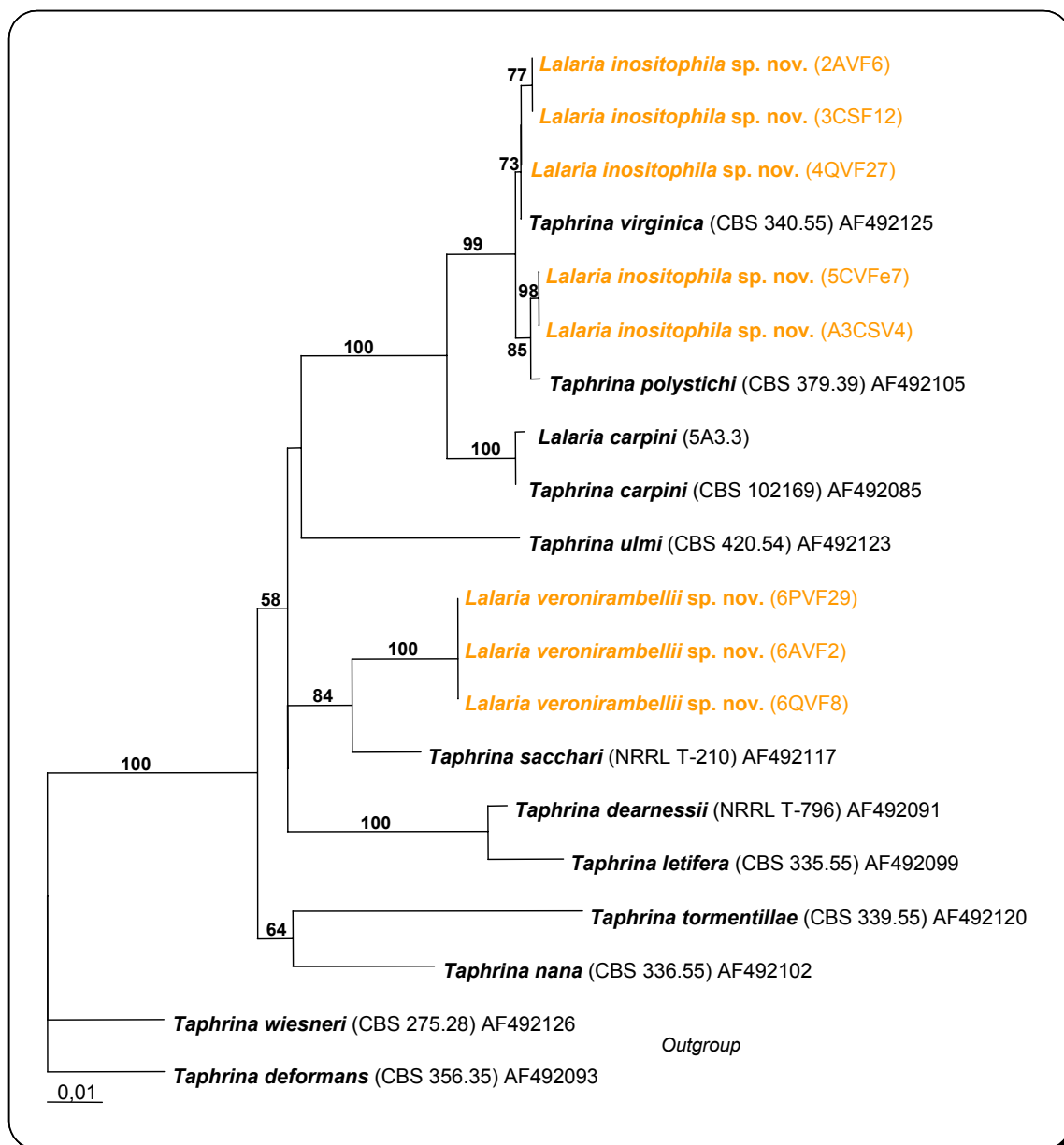


Figura 3.32. Árvore filogenética baseada na análise das sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA de membros dos Arquiascomicetáceas, obtida com o método *Neighbor-Joining* (distância: K2P). A robustez da árvore foi testada com uma análise de *bootstrap* utilizando 1000 repetições. A escala indica as substituições acumuladas por cada 100 nucleótidos. Em frente de cada espécie é indicado o número de acesso do *GenBank* para a sequência correspondente. As sequências determinadas neste estudo estão realçadas a laranja.

sp. nov., e que também inclui uma estirpe isolada de inflorescências de *Ac. monspessulanum*, 6AVL3. Todos os outros perfis são únicos.

A análise das árvores filogenéticas apresentadas nas Figuras 3.31 e 3.32 sugere que *L. veronirambelli* sp. nov. representa provavelmente uma nova espécie. Também se concluiu que as estirpes 2PSF2 e 5CVFe25 representam novas espécies de anamorfos de *Taphrina*, designadas por *L. arrabidae* sp. nov. e *L. kurtzmanii* sp. nov., respectivamente (Figura 3.31). Um caso mais interessante é constituído por *L. inositophila* sp. nov., em que estirpes representantes de todos os tipos de perfis de MSP-PCR encontrados (A, B, C e D) apresentam sequências da região D1/D2 idênticas entre si e iguais às de *Tap. virginica* (CBS 340.55), *Tap. polystychi* (CBS 379.39) e *Tap. wiesneri* (CBS 275.28) (Figura 3.31). As sequências da região ITS destas estirpes, com a excepção de *Tap. wiesneri* (CBS 275.28), são também muito semelhantes (Figura 3.32), sugerindo a sua conspecificidade. Foi determinado o grau de homologia do DNA genómico entre alguns pares destas estirpes. Em relação a *L. inositophila* sp. nov., verificou-se que 2AVF6 apresentava valores de homologia DNA/DNA da ordem dos 90% com 3CSF12, 5CVFe7, A3CSV3, *Tap. virginica* (CBS 340.55) e *Tap. polystychi* (CBS 379.39). Também com valores elevados (82%), e em consonância com estes últimos resultados, encontrou-se o par *Tap. virginica* – CBS 340.55/*Tap. polystychi* – CBS 379.39. A homologia DNA/DNA entre 2AVF6 e *Tap. wiesneri* foi da ordem dos 3%, e entre 2AVF6 e 5A3.3 da ordem dos 8%.

Todos estes resultados sugerem, portanto, a conspecificidade entre as estirpes classificadas como *L. inositophila* sp. nov., *Tap. virginica* (CBS 340.55) e *Tap. polystychi* (CBS 379.39). Rodrigues e Fonseca (2003) indicam também uma possível conspecificidade entre *Tap. virginica* e *Tap. polystychi* baseados na informação das sequências das regiões D1/D2 e ITS, mas consideraram prematuro proceder a alterações taxonómicas, aguardando o estudo de mais estirpes. As estirpes pertencentes a *L. inositophila* sp. nov. parecem ubíquas no filoplano de diversas plantas, vivendo saprofiticamente. Algumas delas, inclusivamente, foram isoladas quando se tentava recolher estirpes de *Tap. deformans* a partir de folhas de pessegueiro com sintomas de doença (Inácio *et al.*, resultados não publicados). Não se pode excluir, portanto, que as estirpes CBS 340.55 e CBS 379.39 representem o que designamos por *L. inositophila* sp. nov., recolhidas quando se tentou isolar originalmente *Tap. virginica* e *Tap. polystychi* dos seus respectivos hospedeiros infectados. Para confirmar a identidade destas estirpes de *Taphrina* teriam de ser realizadas experiências de inoculação controlada nos respectivos hospedeiros. Como tal não foi possível, os isolados são por agora classificados como *L. inositophila* sp. nov.

CAPÍTULO IV
Aspectos fisiológicos e bioquímicos das
leveduras isoladas

IV.1. Introdução

É concebível que as leveduras do filoplano tenham propriedades específicas que lhes permitam sobreviver e multiplicar-se no ambiente que habitam, nomeadamente a capacidade de utilizarem componentes das células vegetais ou seus exsudados. Nesse sentido, foi decidido realizar uma pesquisa de natureza preliminar sobre a assimilação de compostos aromáticos, ácidos aldáricos e aminoácidos, assim como apreciar a produção de certas enzimas extracelulares, de pigmentos e de compostos antimicrobianos, utilizando uma selecção das leveduras isoladas do filoplano das plantas em análise. Com a excepção de alguns estudos relativamente incipientes (McCormack *et al.* 1994, Middelhoven 1997), existe uma lacuna no conhecimento sobre as actividades mais ou menos específicas das leveduras do filoplano, e a sua possível relevância ecológica. Estas pesquisas poderão ainda ser úteis para a selecção de microrganismos potencialmente importantes do ponto de vista biotecnológico (Cardenas *et al.* 2001, Haba *et al.* 2000, Strauss *et al.* 2001).

Como já referido no Capítulo I, as barreiras lipídicas das membranas celulares e da cutícula das folhas dificultam a libertação de nutrientes para a sua superfície, impedindo a sua utilização pelos microrganismos colonizadores. A produção de enzimas que consigam degradar estas estruturas poderá representar uma vantagem competitiva importante para esses microrganismos (Middelhoven 1997). Uma das actividades pesquisadas foi assim a produção de lipases extracelulares (hidrólise do azeite e/ou de TWEEN 80). A cutina é o lípido da cutícula, composto por cadeias longas de hidroxiácidos alifáticos, com ligações éster. Além da hidrólise das ligações éster, e como a sua estrutura também pode ser afectada pela oxidação das cadeias alifáticas laterais, foi testada a assimilação oxidativa do *n*-hexadecano utilizado como modelo para esse tipo de alteração (Middelhoven 1997). As paredes celulares vegetais contêm em abundância material lenho-celulósico que é constituído por celulose, hemicelulose (arabinoxilano) e lenhina. A celulose contribui para a rigidez da parede celular, sendo o seu polissacárido mais abundante, e consiste num polímero linear de glucose. A fracção hemicelulósica origina, essencialmente, D-xilose (a pentose dominante), L-arabinose, D-glucose, D-galactose e D-manose. A lenhina é dificilmente biodegradável e os seus compostos precursores são os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, formando polímeros cujas subunidades estão ligadas segundo um modo não linear. Estão ainda presentes pectinas que são constituídas por cadeias de ácido D-galacturónico parcialmente metilado. O composto desmetilado é conhecido por ácido péctico ou ácido poligalacturónico. Esta cadeia pode, por vezes, ser interrompida com resíduos de L-ramnose, a que se podem ligar outras cadeias laterais, constituídas principalmente por subunidades de L-arabinose e D-galactose. Em algumas pectinas, o ácido ferúlico pode estar terminalmente ligado a estes resíduos. Todos estes compostos

formam uma malha com as fibras de celulose, criando uma estrutura rígida que constitui a parede celular das células vegetais. A produção de enzimas que degradem estes polissacáridos tem um papel importante na fitopatogenicidade, pois a degradação das paredes celulares vegetais permitirá a entrada dos fungos fitopatogénicos para os tecidos interiores das folhas, disponibilizando os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento (St. Leger *et al.* 1997). Neste contexto, pesquisou-se a produção extracelular de celulasas (utilizando carboximetilcelulose como substrato), de xilanases (hidrólise de xilano) e de pectinases (hidrólise de ácido poligalacturónico e de pectina). A assimilação de açúcares de baixo peso molecular (sacarose, maltose, celobiose, L-sorbose, salicina, L-arabinose, etc.) e de polissacáridos de reserva, como a inulina e o amido, presentes nas células vegetais de várias plantas (Pigman 1957), pode também constituir uma importante característica dos colonizadores do filoplano. A utilização de compostos aromáticos (p.e. ácidos *p*-cumárico, ferúlico, gálico e tânico), alguns dos quais com um papel importante na estrutura da lenhina e na defesa das plantas contra insectos, constituirá, porventura, uma vantagem (Middelhoven 1997). Estas últimas características, como a utilização de açúcares e compostos aromáticos resultantes da hidrólise da lenhina, foram, porém, analisadas no âmbito dos testes convencionais para identificação dos isolados (ver Cap. III e Apêndice II). Foi ainda pesquisada a produção de proteases extracelulares (hidrólise de gelatina, hidrólise de caseína e produção de aminopeptidases) e a assimilação de aminoácidos como fonte de carbono e energia, assim como a capacidade de produção de DNAses e RNAses. Estas enzimas poderão disponibilizar nutrientes por degradação das macromoléculas (proteínas e ácidos nucleicos) existentes nas células vegetais e em outros organismos presentes nas folhas.

Para além de pigmentos rosa-salmão, do tipo carotenóide, algumas leveduras são capazes de produzir, em determinadas condições, pigmentos escuros do tipo melanina. Estas moléculas complexas têm sido associadas à patogenicidade de certos fungos (p.e. como facilitadores da penetração dos fungos nos tecidos vegetais, ou como factor de virulência de *Cryptococcus (Filobasidiella) neoformans*), e ao aumento da resistência dos esporos a condições ambientais adversas como a exposição à radiação solar e a resistência a compostos antimicrobianos produzidos pelas plantas (Butler e Day 1998, Wang e Casadevall 1994). As melaninas são macromoléculas de cor castanho escuro a preto, compostas por monómeros fenólicos ou indólicos e formam complexos com proteínas e, muitas vezes, com hidratos de carbono. Algumas melaninas encontram-se ligadas à parede da célula. Outras podem difundir-se para o meio de cultura. Ainda noutros casos, os microrganismos podem secretar enzimas, como por exemplo lacases/fenoloxidasas, que originam a produção extracelular de melaninas a partir de precursores existentes nos meios de cultura (Butler e Day 1998). É de notar, no entanto, que as condições que os fungos

encontram nos meios de cultura artificiais não são, necessariamente, as mesmas que nos seus micro-habitats, pelo que a produção de melaninas em laboratório deverá ser interpretada como a capacidade que as células têm para produzir este tipo de pigmentos. Entre os precursores utilizados pelos fungos na formação de melaninas estão o catecol, 3,4-di-hidroxifenilalanina (DOPA), triptofano, aminofenóis e diaminobenzenos, e ácido protocatecuico (Butler e Day 1998, Chaskes e Phillips 1973, Chaskes e Tyndall 1975, 1978a, b, Nurudeen e Ahearn 1979). A produção deste tipo de pigmentos tem sido referida para várias espécies de leveduras (Chaskes e Tyndall 1978a, b), como por exemplo *Fi. neoformans*, *Cryptococcus albidus*, *Candida albicans* e *C. tropicalis*. Petter *et al.* (2001) detectaram a produção de lacases por uma série de leveduras/fungos heterobasidiomicetas, utilizando como precursores DOPA e norepinefrina, nomeadamente por estirpes de *Filobasidium*, *Tremella* e *Cryptococcus* (*Cr. bhutanensis* e *Cr. podzolicus*, entre outros), mas não por elementos dos géneros *Bensingtonia*, *Bullera*, *Bulleromyces*, *Cystofilobasidium*, *Fellomyces*, *Leucosporidium*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus* e *Sporobolomyces*. Esta característica poderá, ainda, ter alguma relevância taxonómica e ser útil para a diferenciação entre espécies.

Vários estudos descrevem a produção de compostos antimicrobianos por leveduras e fungos dimórficos (Baigent e Ogawa 1960, Bilinski *et al.* 1985, Lehmann *et al.* 1987, McCormack *et al.* 1994, Motzel e Cook 1958, Starmer *et al.* 1987, Walker *et al.* 1995). Entre estes compostos antimicrobianos encontram-se as toxinas *killer*, micocinas proteicas tóxicas para outras leveduras (Golubev *et al.* 1996, Golubev e Nakase 1997, Vadkertiová e Sláviková 1995). Há autores que defendem que a produção de compostos antimicrobianos por leveduras frequentemente presentes no filoplano é um fenómeno comum, e não partilhado por leveduras presentes em outros ambientes (McCormack *et al.* 1994). Mais recentemente, a utilização de leveduras como agentes de biocontrolo de microrganismos fitopatogénicos tem sido explorada (Chand-Goyal e Spotts 1996, 1997, Droby *et al.* 1999, Filonow *et al.* 1996, Janisiewicz e Bors 1995). Foi, por exemplo, demonstrado que *Pseudozyma flocculosa* pode ser usada no biocontrolo de fungos patogénicos devido à produção de um ácido gordo extracelular com acção antifúngica (Avis e Bélanger 2001). No entanto, este biocontrolo poderá não estar obrigatoriamente relacionado com a produção de compostos antimicrobianos extracelulares, podendo ser atribuído ao poder competitivo das leveduras pelos nutrientes disponíveis relativamente aos organismos fitopatogénicos.

IV.2. Material e Métodos

IV.2.1. Produção de proteases

Hidrólise de L-alanina 7-amida-4-metil-cumarina

Para a determinação da produção de aminopeptidases extracelulares foi utilizado um método baseado na degradação do composto L-alanina 7-amida-4-metil-cumarina (Sigma) em meio de cultura sólido. Este composto, um derivado de aminoácido ligado a um fluorocromo, emite um sinal fluorescente muito fraco quando irradiado com luz ultra-violeta (UV), devido à redução da fluorescência por o aminoácido L-alanina se encontrar ligado ao fluorocromo. Se ocorrer hidrólise da ligação peptídica entre o aminoácido e o fluorocromo, pela acção de aminopeptidases, este fica livre e o sinal fluorescente aumenta consideravelmente após excitação com luz UV. A metodologia foi semelhante à utilizada por Manzanares *et al.* (1999) para a detecção de β -D-xilosidase extracelular em leveduras, com base na hidrólise do composto 4-metil-umbeliferil- β -D-xilósido, visualizada pela formação de halos fluorescentes em meio sólido em redor das colónias.

Neste trabalho foi utilizado o seguinte meio sólido base indutor da produção de aminopeptidases: peptona 0,3% p/v, *soytone* 0,3%, extracto de levedura 0,3%, extracto de malte 0,3% e agar 1,5%. Sobre este meio foi espalhado, com a ajuda de uma vareta de vidro, 0,1 ml de uma solução 10 mg/ml de L-alanina 7-amida-4-metil-cumarina esterilizada por filtração. Uma levedura foi inoculada em cada quadrante desta placa (Figura 4.1A). A produção de aminopeptidases foi verificada após 4-5 dias de incubação à temperatura ambiente. Um teste positivo correspondeu à presença de um halo fluorescente em redor da cultura de levedura quando as placas foram expostas num transiluminador a uma fonte de luz UV. Para o controlo negativo deste ensaio, as leveduras foram inoculadas no mesmo meio mas na ausência de substrato fluorescente.

Hidrólise de gelatina

A hidrólise de gelatina foi pesquisada de acordo com Yarrow (1998). Preparou-se uma solução de gelatina (BDH) 10% p/v em 90% do volume final de água desmineralizada aquecida em micro-ondas. Distribuiu-se 4,5 ml desta solução por tubos de ensaio e esterilizou-se em autoclave durante 15 min a 120 °C. Após esterilização, adicionou-se 0,5 ml de uma solução estéril de YNB (Difco) 6,7% e glucose 5%. Deixou-se solidificar o meio de cultura mantendo os tubos numa posição vertical.

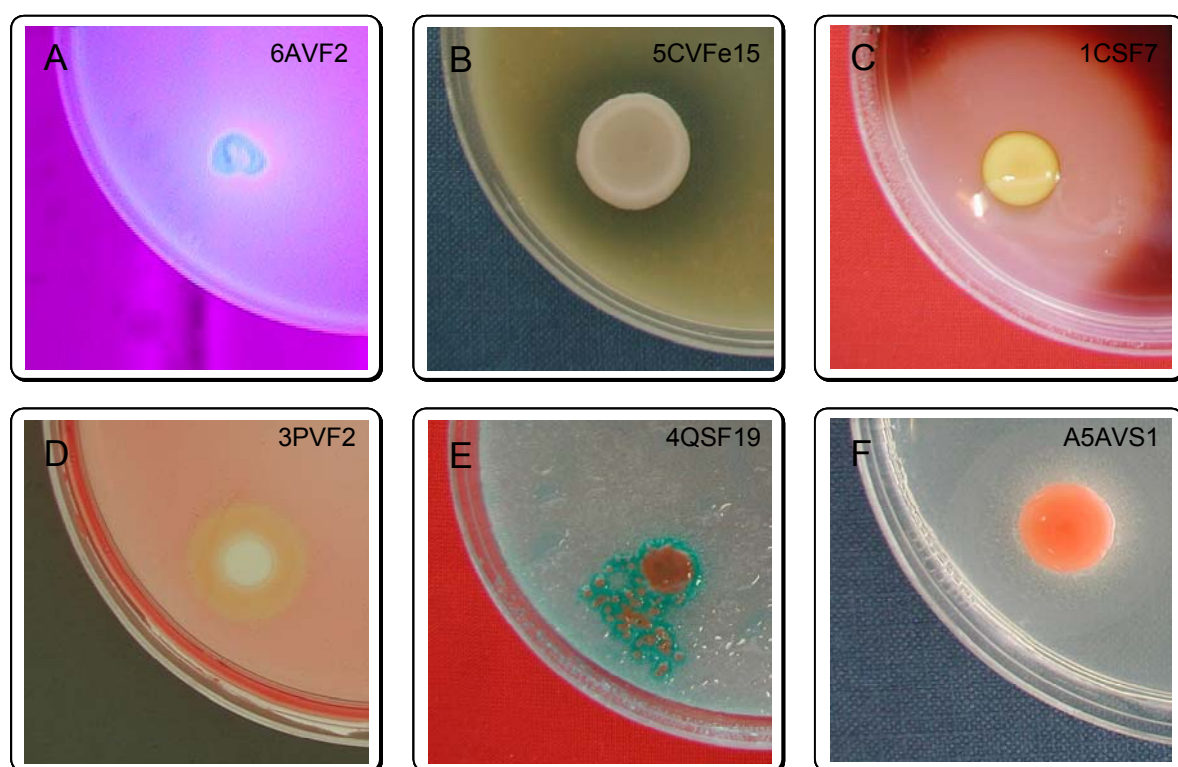


Figura 4.1. Ilustração dos ensaios para detecção de actividades enzimáticas: hidrólise de L-alanina 7-amida-4-metil-cumarina por *Lalaria* sp. (A); caseína por *Cryptococcus* sp. (B); amido por *Cryptococcus* sp. (C); carboximetilcelulose por *Erythrobasidium* sp. (D); azeite por *Sporobolomyces* sp. (E); e Tween 80 por *Sporobolomyces* sp. (F).

Os tubos foram inoculados com uma gota de uma suspensão aquosa, medianamente turva, da cultura de levedura. A hidrólise da gelatina foi verificada após 1 e 3 semanas, registrando a altura do meio liquefeito.

Hidrólise da caseína

Foi seguido o protocolo descrito por Phaff *et al.* (1994), utilizando um meio de cultura com extracto de carne (Difco) 0,3% p/v, triptona (Difco) 0,5%, glucose 0,1% e agar 1,7% em apenas 88% do volume final de água desmineralizada. Preparou-se uma suspensão de leite magro em pó (Difco) 2,4% p/v, em 12% do volume final de água desmineralizada. Após esterilização separada durante 15 min a 120 °C as duas soluções foram misturadas e distribuídas por placas de Petri formando-se um meio opaco. Inoculou-se uma cultura de levedura em cada quadrante de uma placa de Petri à superfície do meio sólido e as placas foram incubadas durante 4 - 7 dias à temperatura ambiente. A hidrólise da caseína foi detectada pela formação de um halo translúcido em redor da cultura de levedura (Figura 4.1B).

IV.2.2. Produção de polissacarases

Amilases

Preparou-se uma solução de amido solúvel (Difco) 1% p/v e agar 2%, adicionando apenas 90% do volume final de água desmineralizada. Após esterilização em autoclave durante 15 min a 120 °C, foi adicionado 10% do volume final com uma solução de YNB (Difco) 6,7% p/v, esterilizada por filtração, e a mistura foi distribuída por placas de Petri. Cada levedura foi inoculada num quadrante da placa que foi depois incubada durante 4 - 7 dias à temperatura ambiente. A hidrólise do amido foi revelada pela presença de um halo claro em volta das culturas após terem sido borrifadas com Solução de Lugol (Figura 4.1C).

Xilanases

Foi utilizado um meio com a seguinte composição (Abdel-Sater e El-Said 2001): xilano (Sigma) 0,5% p/v, peptona 0,5%, extracto de levedura 0,5%, fosfato di-potássico 0,1%, sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,02% e agar 2%, esterilizado durante 15 min a 120 °C. Cada levedura foi inoculada por quadrante da placa de Petri, depois incubada durante 4 - 7 dias à temperatura ambiente. A hidrólise do xilano foi detectada pela formação de um halo claro em redor da cultura. A revelação com uma solução 0,03% p/v de vermelho do Congo, seguida de uma lavagem de 15 min com uma solução 1 M de cloreto de sódio, facilitou um pouco a visualização destes halos que, no entanto, nunca eram muito nítidos.

Celulases

Foi preparado um meio com carboximetilcelulose (BDH) 1% p/v, celobiose 0,05% e agar 1%, em 90% do volume final de água desmineralizada. Após esterilização em autoclave durante 15 min a 120 °C, adicionou-se uma solução estéril de YNB (Difco) 6,7% em 10% do volume final e distribuiu-se a mistura por placas de Petri. Cada levedura foi inoculada por quadrante de uma placa, depois incubada durante 4 - 7 dias à temperatura ambiente. A revelação da actividade celulásica foi feita por aplicação de uma solução 0,03% de vermelho do Congo, durante 15 min, seguida de lavagem com uma solução 1 M de cloreto de sódio (Teather e Wood 1982). A hidrólise de carboximetilcelulose foi detectada pela formação de um halo com um tom amarelado em redor da cultura de levedura (Figura 4.1D).

IV.2.3. Produção de pectinases

Preparou-se o meio base, em 90% do volume final de água desmineralizada, com a seguinte composição: extracto de levedura 0,1% p/v, pectina (de citrinos ou maçã) (Sigma) ou ácido poligalacturónico (Sigma) 0,5% e agar 1,5%. Esterilizou-se durante 15 min a 120 °C. Este meio foi preparado em duplicado, uma parte foi ajustada a pH 5 e a outra a pH 7. Também em duplicado, e em 10% do volume final, preparou-se uma solução de sulfato de amónio 0,1% p/v, fosfato de potássio 0,5%, sulfato de magnésio 0,05% e cloreto de cálcio di-hidratado 0,0132 % (dissolvido à parte). Procedeu-se ao ajuste, tal como anteriormente, a pH 5 e a pH 7. Após esterilização em autoclave durante 15 min a 120 °C, adicionou-se à solução anterior 0,07% v/v de cada solução estéril de oligoelementos A e B (Ver Apêndice I). Juntou-se ao meio base de pectina/ácido poligalacturónico a solução de sais e distribuiu-se por placas de Petri. Cada levedura foi inoculada e incubada como descrito anteriormente. Após crescimento, a actividade pectinásica foi revelada com uma solução aquosa 1% p/v de brometo de hexadeciltrimetilamónio que precipitou a pectina não hidrolisada, formando-se um halo mais claro em redor das culturas. A pH 5 foi detectada a produção de pectinase e a pH 7 a produção de pectato-liase (Hankin e Anagnostakis 1975).

Degradação oxidativa de *n*-hexadecano

Uma solução de agar 2% p/v foi liquefeita em 90% do volume final de água desmineralizada e distribuída (4,5 ml) por tubos de ensaio. Após esterilização em autoclave durante 15 min a 120 °C, adicionou-se a cada tubo 0,5 ml de uma solução estéril de YNB (Difco) 6,7% e deixou-se solidificar em cunha. A levedura foi inoculada e depositou-se uma gota (~ 50 µl) de *n*-hexadecano no fundo do tubo de ensaio. O crescimento da levedura indica a degradação oxidativa do *n*-hexadecano, entretanto difundido pelo meio sólido (Middelhoven 1993).

IV.2.4. Produção de nucleases

Para testar a actividade de DNAses, preparou-se um meio com triptona 2% p/v, DNA de esperma de salmão 0,2% (Sigma), cloreto de sódio 0,5% e agar 1,5%, ajustado a pH 6, esterilizado e distribuído por placas de Petri (Hankin e Anagnostakis 1975). Para ensaiar a actividade de RNAses preparou-se um meio com glucose 0,5%, *vitamin-free casamino acids* (Difco) 0,5%, fosfato de potássio di-hidrogenado 0,5%, cloreto de sódio 0,2%, sulfato de ferro 0,005%, sulfato de magnésio hepta-hidratado 0,05% e agar 1,5%, em 80% do volume final de água desmineralizada. Após esterilização em autoclave durante 15 min a 120 °C, adicionou-se ao meio liquefeito, em 20% do volume final, uma solução aquosa de RNA de *Torula* (BDH) (de modo a obter-se uma concentração no volume final de 2 mg/ml), previamente preparada alcalinizando com hidróxido de sódio 1 N até dissolução completa (Hankin e Anagnostakis 1975). Cada levedura foi inoculada e as placas incubadas como descrito anteriormente. A revelação da actividade nucleásica foi feita com uma solução 1 N de ácido clorídrico, que precipitou os ácidos nucleicos não degradados.

IV.2.5. Produção de lipases

Hidrólise de azeite

Foi utilizado meio de Gorodkova com a seguinte composição: glucose 0,1% p/v, peptona 1%, cloreto de sódio 0,5% e agar 2%. Após esterilização como descrito anteriormente, suplementou-se o meio com 5% p/v de azeite esterilizado em autoclave, agitou-se e distribuiu-se por placas de Petri. Cada levedura foi inoculada e as placas incubadas como descrito anteriormente. A revelação da actividade lipásica foi feita com uma solução saturada de sulfato de cobre durante 10 min, correspondendo um resultado positivo ao desenvolvimento de um halo azulado em redor da cultura (Figura 4.1E). Este halo intensificou-se arrefecendo as placas a 4 °C durante 6 – 8 h.

Hidrólise de TWEEN 80

Foi utilizado o mesmo meio de Gorodkova suplementado, após esterilização, com 0,01% p/v de cloreto de cálcio e 2,5% v/v de Tween 80 esterilizado em autoclave. Após inoculação, como atrás descrito, as placas foram incubadas durante 4 - 7 dias à temperatura ambiente. Um resultado positivo correspondeu à precipitação de sais de cálcio em redor das culturas (Figura 4.1F), formados pela libertação dos ácidos gordos, ou pela formação de um precipitado menos denso à volta da cultura, devido à hidrólise completa do ácido gordo.

IV.2.6. Utilização de aminoácidos e compostos aromáticos como fonte de carbono e de energia

Foram preparadas soluções de cada aminoácido (0,6% p/v) em 50% do volume final de água desmineralizada. Após ajuste do pH a 4,5 com ácido clorídrico/hidróxido de potássio, a solução foi esterilizada por filtração. Os aminoácidos testados foram: prolina, serina, glutamato, aspartato, glicina, leucina, valina, metionina, histidina, arginina, lisina, fenilalanina e triptofano. O agar 1,5% p/v, esterilizado separadamente em 40% do volume final de água desmineralizada, foi adicionado à solução de aminoácido e a uma solução estéril de YNB (Difco) 6,7% em 10% do volume final. A mistura foi distribuída por placas de Petri. Como controlo negativo, foi utilizado o mesmo meio de cultura sem aminoácido. As placas foram inoculadas com uma suspensão diluída das culturas de leveduras e incubadas 5 – 7 dias ao abrigo da luz, à temperatura ambiente.

Os meios de cultura com ácido cafeico ou ácido *p*-cumárico 0,1% p/v foram preparados e incubados de forma análoga.

IV.2.7. Produção de pigmentos tipo-melanina

Foram utilizados diferentes compostos como precursores da produção de pigmentos tipo-melanina. Preparou-se, em 40% do volume final do meio de cultura, as seguintes soluções aquosas: 3-aminofenol (mAP) 0,05% p/v, ácido 3,4-diaminobenzóico (DABA) 0,1%, ácido 4-aminosalicílico (pASA) 0,1%, 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) 0,02%, ácido 2,5-diaminobenzenosulfóxido (DBSA) 0,05%, ácido protocatecuico (PA) 0,1%, ácido gálico (GA) 0,1%, ácido gentísico (GeA) 0,1%, L-triptofano 0,1% e L-tirosina 0,01%. O pH foi ajustado a 5,5 e as soluções esterilizadas por filtração. O agar (1,5% p/v) foi esterilizado separadamente, em autoclave, em 40% do volume final. Juntou-se o agar à solução de cada composto precursor da produção de pigmentos, a 10% do volume final de uma solução de YNB (sem NH_4^+ e sem aminoácidos) (Difco) estéril, 10 vezes concentrada, e a 10% do volume final de uma solução estéril de glucose 0,5% e PDC (*Pancreatic Digest of Casein*, Biokar Diagnostics) 3%, a pH 5,5. As placas com o meio sólido foram inoculadas com uma suspensão forte das culturas de leveduras e incubadas 5 – 7 dias ao abrigo da luz. Como controlo negativo, utilizou-se o mesmo meio sem composto precursor. A formação de pigmentos foi detectada pelo escurecimento das culturas e/ou difusão de pigmentos para o meio. A irradiação do meio com uma fonte de luz UV facilitou a detecção da produção destes compostos melanizados.